

**Auswirkung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF)
auf die Expression onkologisch relevanter Gene
in einer BHY-Plattenepithelkarzinomzelllinie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Julia Caroline Schmidt
aus Bonn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. H. Reich
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.05.2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie, Rheinische
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. H. Reich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	9
1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Ätiologie	9
1.1.3 Einteilung: TNM-Klassifikation	12
1.1.4 Makroskopische und mikroskopische Anatomie	15
1.1.5 Molekularpathologie: Onkologisch relevante Gene	16
1.1.5.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor	16
1.1.5.2 Defensine	20
1.1.5.3 S100 Proteine	24
1.1.5.4 Doc-1	26
1.1.5.5 Ki67	26
1.1.6 Therapie	27
1.1.7 Prognose	28
1.2 Fragestellung	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material und Reagenzien	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Übersicht	31
2.2.2 Kultivierung von BHY-Plattenepithelkarzinomzellen	31
2.2.3 Stimulation von BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit rhEGF	32
2.2.4 Extraktion der RNA	32
2.2.5 Reverse Transkription	33
2.2.5.1 Übersicht	33
2.2.5.2 Protokoll der reversen Transkription	33
2.2.6 Realtime-Polymerasekettenreaktion	33
2.2.6.1 Übersicht	33
2.2.6.2 Primersequenzen	35
2.2.6.3 Protokoll der Realtime-Polymerasekettenreaktion	36

2.2.6.4	Referenzgene	37
2.2.6.5	Berechnung der relativen Genexpression	37
2.2.7	Statistische Analysen	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Relative Genexpression in unstimulierten Zellen	41
3.2	Relative Genexpression von hBD-1	41
3.3	Relative Genexpression von hBD-2	42
3.4	Relative Genexpression von hBD-3	42
3.5	Relative Genexpression von DEFA1	42
3.6	Relative Genexpression von DEFA4	43
3.7	Relative Genexpression von S100A7	43
3.8	Relative Genexpression von S100A4	43
3.9	Relative Genexpression von Doc-1	43
3.10	Relative Genexpression von Ki67	44
3.11	Relative Genexpression von EGF	44
3.12	Relative Genexpression von EGFR	44
4	Diskussion	52
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	66
7	Danksagung	86
8	Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
AP-1	Activating enhancer binding protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pairs, Basenpaare
c-fos	Cellular FBJ osteosarcoma oncogene
c-myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
C-terminal	Carboxy-terminal
Ca^{2+}	Calciumion
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR6	Chemokine receptor 6
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Copy desoxyribonucleic acid
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
C_t	Threshold cycle
CTACK	Cutaneous T-cell-attracting chemokine
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAG	Diacylglycerol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
DEFA	Defensin alpha
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Doc-1	Deleted in oral cancer-1
dT	Deoxy thymidine
dtTP	Deoxythymidintriphosphat
DÖSAK	Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich

E	Effizienz
E-Cadherin	Epithelial calcium dependent adhesion molecule
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Elk-1	E-26 like protein-1
ERK	Extracellular regulated kinase
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
G-Phase	Gap phase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hBD	Human beta-defensin
HD	Human defensin
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HRas	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP-10	Interferon-inducible protein-10
JNK	Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KRas	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μl	Mikroliter
min.	Minuten
ml	Milliliter
MMLV	Moloney murine leukemia virus
n	Anzahl

N-terminal	Amino-terminal
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NRas	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OH	Hydroxy
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38	MAPK
P450	Pigment absorbing at 450nm
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-phosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-phosphat
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
%	Prozent
pT	histopathologische Invasionstiefe eines Karzinoms
PTB	Phosphotyrosine binding
R0	vollständige Tumorresektion
rhEGF	Recombinant human epidermal growth factor
RLT	RNeasy lysis thioyanate
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RTqPCR	Real-Time-quantitative-Polymerase chain reaction
s	Sekunde
SH2	Src homology 2
STAT	Signal transducers and activators of transcription
t	Zeit
T_m	Schmelztemperatur
Taq	Thermus aquaticus
TGF- α	Transforming growth factor- α
TM	Trademark
TNF- α	tumor necrosis factor- α , Tumornekrosefaktor- α
TNM	Tumor, nodulus, metastase
UICC	Union International Contre le Cancer

UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol.	Volumen
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family

1 Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, der Lippen und des Rachens sind die häufigsten malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes, die einen Anteil von etwa 4–5 % an allen malignen Neoplasien besitzen (Howaldt et al., 2000). Mehr als 95 % der malignen Tumoren der Mundhöhle sind Plattenepithelkarzinome (Mehrotra und Yadav, 2006). Die jährliche Inzidenz der oralen Plattenepithelkarzinome beträgt in Deutschland etwa 10.000 mit weltweit zunehmender Erkrankungshäufigkeit (Reuther et al., 2006).

Das Durchschnittsalter der Patienten liegt zwischen dem sechsten und siebten Lebensjahrzehnt. Männer sind in dieser Altersgruppe wesentlich häufiger betroffen als Frauen (Llewellyn et al., 2003). In westlichen Ländern liegt die Inzidenz des oralen Plattenepithelkarzinoms bei Patienten unter 40 Jahren bei 0,4–3,6 %. Es wird jedoch eine steigende Inzidenz bei jüngeren Männern und Frauen beobachtet (Llewellyn et al., 2001).

Besonders hohe Inzidenzen für orale Tumoren finden sich in Entwicklungsländern wie Süd- und Südostasien sowie Indien. Der Anteil oraler Tumoren an allen malignen Tumoren beträgt in Indien etwa 30–40 %. Unter diesen Patienten sind geschätzte 16–28 % jünger als 40 Jahre (Llewellyn et al., 2001).

1.1.2 Ätiologie

Epitheliale Neoplasien der Mundhöhle durchlaufen die Stadien der Hyperplasie und Dysplasie bevor sie als Carcinoma in situ und schließlich als invasives Karzinom klassifiziert werden (Nagpal und Das, 2003). Verschiedene präkanzeröse Läsionen und Konditionen können Ausgangspunkt maligner Transformationen sein. Zu den präkanzerösen Läsionen zählen die Erythroplakie sowie die Leukoplakie. Aufgrund des klinischen Befundes werden die homogene und die inhomogene Leukoplakie unterschieden. Letztere liegt in Form der gefleckten, der knotenförmigen oder der verrukösen Leukoplakie vor (Warnakulasuriya et al., 2007).

Etwa 11–67 % der Mundhöhlenkarzinome entwickeln sich aus Präkanzerosen (Reichart, 2000). Die große Streubreite dieser Angaben wird durch unterschiedliche Definitionen des klinischen Begriffes Leukoplakie und variierende Untersuchungsmethoden erklärt. Präkanzerosen sind folglich ein fakultativer Zustand in der schrittweisen Entstehung des Karzinoms (Scheifele und Reichart, 1998).

Karzinogene Noxen können auf die gesamte orale Mukosa einwirken und im Sinne der Feldkanzerisierung zu multiplen Karzinomen und synchron vorhandenen Präkanzerosen bei einem Patienten führen (Oijen und Slootweg, 2000). Klinisch normal erscheinende orale Mukosa kann daher Entstehungsort einer malignen Transformation sein und korrespondiert nicht zwangsläufig mit dem anatomischen Ort einer Präkanzerose (Warnakulasuriya et al., 2007). Scheifele et al. fanden nicht-tumorassoziierte Leukoplakien bei 4 % der Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom (Scheifele und Reichart, 1998).

Tabakkonsum und chronischer Alkoholabusus sind in Nordamerika und Europa die wichtigsten primären ätiologischen Faktoren für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms. Tabak enthält verschiedene karzinogene und prokarzinogene Substanzen. Dazu zählen die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren sowie die tabakspezifischen Nitrosamine wie Nitrosonornicotin. Das Prokarzinogen Benzo[a]pyren beispielsweise wird durch oxidative Enzyme, insbesondere Cytochrom P450, in eine reaktive karzinogene Substanz umgewandelt (Mehrotra und Yadav, 2006). Als wichtigste Form des Tabakkonsums gilt das Rauchen der verschiedenen Tabakformen. 90 % der an oralen Plattenepithelkarzinomen erkrankten Patienten sind Raucher, jedoch auch Tabakkonsum in Form von Kautabak ist ein Risikofaktor für orale Tumoren (Rasse, 2008). Das durch Tabakkonsum verursachte Erkrankungsrisiko steigt dosisabhängig (Moreno-López et al., 2000; Walker et al., 2003). Alkohol wirkt ebenfalls karzinogen, in Kombination mit Tabakkonsum vervielfachen sich die kanzerogenen Effekte synergistisch. Raucher, die keinen Alkohol trinken, haben gegenüber Nichtrauchern und Nichttrinkern ein 2- bis 4-fach erhöhtes Risiko, ein orales Plattenepithelkarzinom zu entwickeln. Raucher, die gleichzeitig Alkohol in hohen Mengen konsumieren, haben dagegen ein 6- bis 15-fach erhöhtes Risiko gegenüber Nichtrauchern und Nichttrinkern (Reichart, 2000). Verschiedene Wirkungsmechanismen werden in Zusammenhang mit Alkohol diskutiert. Chronischer Alkoholkonsum erhöht in vitro die Permeabilität der Gingiva und der Mundbodenschleimhaut für tabakspezifische Karzinogene. Außerdem wird Cytochrom P450 durch Ethanol induziert, wodurch verschiedene Prokarzinogene zu Karzinogenen aktiviert werden (Blot, 1992; Llewellyn et al., 2001; Walker et al., 2003).

In Indien und anderen asiatischen Ländern ist neben Alkohol und Tabakkonsum das Betelnusskauen allein und in Kombination mit Tabak ein wesentlicher ätiologischer Faktor für die Entstehung von oralen Neoplasien. Die Unterschiede der Inzidenz und der Lokalisation oraler Tumoren in verschiedenen Teilen der Welt beruhen auf den unterschiedlichen ätiologischen Noxen wie dem Betelnusskauen sowie auf genetischen Faktoren (Koontongkaew et al., 2000; Chen et al., 2008).

Auch die ständige Aktivierung immunologischer Prozesse im Rahmen chronischer Entzündungen scheint eine Rolle im Rahmen der oralen Tumorgenese zu spielen. Es wird diskutiert, dass insbesondere Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen durch Freisetzung freier Radikale Schäden an der DNA verursachen und durch parakrine Wirkung auf intrazelluläre Signalkaskaden die Proliferation und Apoptose epithelialer Zellen beeinflussen können. Ferner stimulieren angeborene Immunabwehrzellen die Angiogenese und degradieren durch Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen die extrazelluläre Matrix. Grundsätzlich jedoch wirkt das adaptive Immunabwehrsystem durch Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten tumorinhibierend. Eine Unterdrückung dieser adaptiven Immunabwehrmechanismen durch angeborene Immunabwehrzellen sowie regulatorische T-Lymphozyten wird aber in einer Vielzahl von Tumoren beobachtet (de Visser et al., 2006).

Einen weiteren Risikofaktor in der oralen Tumorgenese stellen Superinfektionen der oralen Mukosa mit humanen Papillomaviren (HPV) dar. Mehr als 120 verschiedene HPV-Typen existieren. Entsprechend dem Vorhandensein oder Fehlen der Viren in hochgradigen Dysplasien oder malignen Tumoren werden sie in Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Virustypen unterteilt. HPV 16, 18, 31, 33 und 35 zählen zu den Hochrisiko-Virustypen, von denen insbesondere HPV 16 in oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen wurde. Das virale Genom von HPV 16 kodiert u.a. die beiden Oncoproteine E6 und E7, die zu einer Fehlregulation von Zellzyklus und Proliferation führen. E6 beispielsweise kann an das Tumorsuppressorprotein p53 binden und dessen Abbau einleiten (Chaudhary et al., 2009; McKaig et al., 1998).

Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung der genetischen Prädisposition als Risikofaktor. Das gehäufte Auftreten oraler Tumorerkrankungen innerhalb einer Familie ist häufig mit dem Beginn der Erkrankung in einem frühen Lebensabschnitt assoziiert. Als erbliche prädisponierende Faktoren gelten u.a. Mutationen von Tumorsuppressorgenen und genetische Polymorphismen in DNA-Reparaturmechanismen (Ankathil et al., 1996; Bongers et al., 1996). Die Bedeutung der Risikofaktoren Alkohol und Tabakkonsum für Patienten unter 40 Jahren ist unklar (Sasaki et al., 2005). Einerseits liegen bei vielen dieser Patienten weder Alkohol noch Tabakkonsum vor, andererseits ist der Zeitraum, in dem sie diesen beiden Risikofaktoren ausgesetzt waren, relativ kurz (Llewellyn et al., 2001).

Die orale Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess und letztendlich noch nicht vollständig geklärt. Genetische Veränderungen innerhalb einer Zelle führen über die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur malignen Transformation (Todd et al., 2002). Spezifische genetische Veränderungen treten in einer bestimmten Reihenfolge auf und korrelieren mit bestimmten histopathologischen Stadien. Ein Progressionsmodell

der zehn häufigsten Chromosomenläsionen für Karzinome im Kopf- und Halsbereich wurde erstellt (Rasse, 2008). Insgesamt ist für die Tumorprogression aber nicht die Reihenfolge der genetischen Veränderungen, sondern vielmehr die Anhäufung entscheidend (Califano et al., 1996). Etwa 6 bis 10 voneinander unabhängige Genmutationen können zum irreversiblen Karzinom führen (Rasse, 2008; Sidransky, 1995).

Protoonkogene sind Gene, die vornehmlich für Elemente wachstumstimulierender Signaltransduktionswege kodieren, also für Wachstumsfaktoren und mitogene Stimuli, deren Oberflächenrezeptoren, intrazelluläre Signalmoleküle und schließlich Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-regulierende Proteine. Durch Mutationen dieser Protoonkogene zu Onkogenen kann etwa durch unkontrollierte Steigerung der Zellproliferation die maligne Transformation einer Zelle begünstigt werden. Die Aktivierung des Protoonkogens c-erb 1 beispielsweise führt zu erhöhter Genexpression und Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und wurde in verschiedenen Tumoren, auch oralen Plattenepithelkarzinomen, nachgewiesen (Grandis und Tweardy, 1993).

Die Aktivierung von Onkogenen und die damit einhergehende Steigerung der Zellproliferation sind allein nicht ausreichend zur malignen Transformation einer Zelle. Daher wird in Tumoren häufig eine zusätzliche Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gefunden, welche Programme wie Apoptose oder Zellalterung und Differenzierung inhibieren. So wurden beispielsweise Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 in 50 % der primären Kopf-Hals-Karzinome beschrieben. Bei irreversibler Schädigung der DNA kann das p53-Protein den Zellzyklus blockieren oder Apoptose einleiten. Funktionsloses p53-Protein jedoch kann genetische Mutationen nicht beseitigen und trägt zur genomischen Instabilität eines Tumors bei (Koontongkaew et al., 2000; Nagpal und Das, 2003; Rasse, 2008).

1.1.3 Einteilung: TNM-Klassifikation

Die Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms unterliegt der TNM-Klassifikation der Union International Contre le Cancer (UICC). Die TNM-Klassifikation zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung des Karzinoms berücksichtigt die Ausbreitung des Primärtumors (T), das Fehlen oder Vorhandensein und die Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen (N) sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Es wird zwischen der klinischen (TNM oder cTNM) und der pathologischen (pTNM) Klassifikation unterschieden. Die prätherapeutische klinische Klassifikation basiert auf einer klinischen Untersuchung sowie bildgebenden Verfahren und wird zur Auswahl und Bewertung der Therapie verwendet. Die postoperative pathologische Klassifikation beeinflusst die Indikation zur adjuvanten Therapie sowie die Prognose (Wittekind und Meyer, 2010).

Klinische und pathologische T-Kategorie

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die Arteria carotis interna

Klinische und pathologische N-Kategorie

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

Die pT- und pN-Kategorien stimmen mit den T- und N-Kategorien überein.

Klinische M-Kategorie

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Pathologische M-Kategorie

pM1 Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt

Die TNM-Klassifikation ist nicht unumstritten. In der Mundhöhle infiltrieren häufig auch kleine Tumoren benachbarte Strukturen, wie den Alveolarfortsatzknochen oder die Mundbodenmuskulatur. Daher werden viele Tumoren bereits als T4 und pT4 klassifiziert. Außerdem werden wenige Lymphknoten dem Stadium N3 oder pN3 zugeordnet, da am Hals selten Lymphknoten mit einem Durchmesser größer 6 cm vorkommen (Howaldt et al., 1999).

Nach Bestimmung der TNM- und pTNM-Kategorien können diese zu Stadien zusammengefasst werden:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVB	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Die TNM-Kategorien werden ergänzt durch die R-Klassifikation, die das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumoren nach Therapie beschreibt und von prognostischer Bedeutung ist (Wittekind und Meyer, 2010). Die Definitionen der R-Klassifikation lauten:

RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor

Orale Plattenepithelkarzinome metastasieren entlang der Lymphgefäße des Halses in regio-

nale Lymphknoten. Ipsilaterale Metastasierung ist bei lateralen Tumoren die Regel. Nahe der Mittellinie lokalisierte Tumoren metastasieren häufig in die ipsi- und kontralateralen Halslymphknoten. Die Lymphknoten des Halses werden den sechs folgenden Levels zugeteilt (Robbins et al., 2001):

Level I	submentale und submandibuläre Lymphknotengruppe
Level II	kraniale juguläre Lymphknotengruppe
Level III	mittlere juguläre Lymphknotengruppe
Level IV	kaudale juguläre Lymphknotengruppe
Level V	Lymphknotengruppe des posterioren Halsdreiecks
Level VI	prälaryngeale, prätracheale und paratracheale Lymphknotengruppe

Die Levels werden meist nacheinander befallen, Sprünge können jedoch vorkommen (Rasse, 2008; Walker et al., 2003). Klinischen Studien zufolge treten Fernmetastasen in malignen Tumoren des Kopf- und Halsbereiches mit einer Inzidenz von 11–24 % auf. Bevorzugte Lokalisationen sind Lunge und Mediastinum (53 %), außerdem Knochen (15 %), Gesichtshaut (7 %), Zentralnervensystem (3 %) und andere Organe (22 %), vor allem die Leber (Spector et al., 2009).

1.1.4 Makroskopische und mikroskopische Anatomie

In westlichen Ländern ist das orale Plattenepithelkarzinom am häufigsten am Mundboden, in der retromolaren Region und an der Zunge lokalisiert und nur in weniger als 5 % der Fälle an der bukkalen Mukosa (Reuther et al., 2006; Squier et al., 1986). In Indien und südostasiatischen Ländern dagegen tritt das orale Plattenepithelkarzinom bevorzugt an der bukkalen Mukosa auf (Llewellyn et al., 2001; Nagpal und Das, 2003).

In einem initialen Stadium können orale Plattenepithelkarzinome das klinische Bild einer leuko- oder erythroplakischen Schleimhautveränderung mit weißlichen sowie rötlich-erosiven Bezirken aufweisen. In fortgeschrittenen Tumorstadien imponieren Plattenepithelkarzinome als exophytische oder endophytische Läsionen. Exophytisch wachsende Plattenepithelkarzinome treten knotenförmig, polypös, papillär oder warzenförmig in Erscheinung. In Abhängigkeit des epithelialen Differenzierungsgrades weisen sie eine eher rötliche oder weißliche Farbe auf. Endophytisch wachsende Plattenepithelkarzinome zeigen klinisch meist einen zentralen Ulkus mit aufgeworfenen Rändern (Torske, 2007).

Histopathologisch zeigen orale Plattenepithelkarzinome invasives Wachstum mit Ausbreitung in das subepitheliale Bindegewebe und je nach Stadium in tiefere Strukturen. Das Tumorstroma weist üblicherweise ein entzündliches Infiltrat auf. Unter Berücksichtigung von epithelalem Keratinisierungsgrad, zellulärer und nukleärer Pleomorphie und mitotischer Aktivität der Tumorzellen werden orale Plattenepithelkarzinome wie folgt eingeteilt (Pereira et al., 2007; Torske, 2007).

Histopathologisches Grading

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Viele histologische und klinische Varianten des oralen Plattenepithelkarzinoms existieren. Dazu zählen beispielsweise das verruköse und das basaloide Karzinom (Pereira et al., 2007; Wittekind und Meyer, 2010).

1.1.5 Molekularpathologie: Onkologisch relevante Gene

1.1.5.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor

Der EGFR bildet zusammen mit den Wachstumsfaktorrezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 eine Unterfamilie der Rezeptortyrosinkinasen, die ErbB-Familie. Diese werden in vielen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert (Olayioye et al., 2000).

EGFR ist sowohl an normaler zellulärer Entwicklung als auch an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen maßgeblich beteiligt. Er spielt eine wichtige Rolle bei zellulärer Proliferation und Differenzierung (Prenzel et al., 2001), aber auch bei Tumoren (Arteaga, 2002) sowie bei entzündlichen Prozessen (Mascia et al., 2003).

Struktur EGFR ist ein Transmembranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Er besteht aus 1186 Aminosäuren und weist drei funktionelle Domänen auf (Ullrich et al., 1984).

Die extrazelluläre Domäne umfasst 621 Aminosäuren und besteht aus zwei Cystein-reichen Regionen sowie zwei Liganden-bindenden Regionen (Ward et al., 1995). Die hydrophobe transmembranäre Domäne umfasst die Aminosäuren 622 bis 644 und weist eine α -Helix-

Struktur auf (Rigby et al., 1998). Die 542 Aminosäuren umfassende intrazelluläre Domäne setzt sich zusammen aus einer juxtamembranären Region, einer katalytischen Tyrosinkinasedomäne sowie einem regulatorischen C-terminalen Segment (He et al., 2002; Hobert et al., 1997).

Lokalisation EGFR ist in Epithelzellen mit polarisiertem Zellaufbau vorwiegend an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert (Hobert et al., 1997). Etwa 40–60 % der EGFR einer Zelle liegen in Caveolae der Plasmamembran. In Abwesenheit von Liganden wird EGFR konstitutiv internalisiert und anschließend zur Plasmamembran zurückgeführt, so dass zellspezifisch eine dynamische Verteilung zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten resultiert (Burke und Wiley, 1999; Kuwada et al., 1998; Wiley, 2003).

Liganden Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Protein aus 53 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 6 kDa. Er bindet mit hoher Affinität an den EGFR (Salomon et al., 1995). Die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin und Heparin-binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) aktivieren ebenfalls den EGFR (Toyoda et al., 1997; Shoyab et al., 1989; Marquardt et al., 1983; Higashiyama et al., 1991; Shing et al., 1993). Alle Liganden des EGFR werden als glykosylierte, integrale Membranvorläuferproteine synthetisiert und nach proteolytischer Spaltung durch Matrixmetalloproteinasen von der Zelloberfläche freigegeben (Dong und Wiley, 2000). Den Liganden gemeinsam ist das sogenannte EGF-Motiv mit sechs konservierten Cysteinresten, die drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Groenen et al., 1997).

Funktionsweise Die Bindung eines Liganden an den EGFR kommt zustande durch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und Ionenbindungen zwischen Aminosäureresten des Liganden und den Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Die Bindung induziert Konformationsänderungen in der extrazellulären Domäne und ermöglicht darauf folgend eine Rezeptordimerisierung (Chantry, 1995; Garrett et al., 2002; Ge et al., 2002). Sowohl Homodimere zwischen zwei aktivierten EGFR als auch Heterodimere zwischen einem aktivierten EGFR und einem anderen ErbB-Rezeptor bilden sich (Chantry, 1995; Tanner und Kyte, 1999). Die Dimerisierung führt zur intermolekularen Autophosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten im C-terminalen Segment (Honegger et al., 1990; Lemmon et al., 1997). Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen verschiedenen intrazellulären Signal- und Adapterproteinen sowie Enzymen mit SH2- oder PTB-Domänen als Bindungsstellen (Schlessinger und Ullrich, 1992). Die aktivierten EGF/EGFR-Komplexe werden endozytiert und in Lysosomen abgebaut (Lev-

kowitz et al., 1998, 1999). Die TGF- α /EGFR-Komplexe dagegen dissoziieren im sauren Milieu der endosomalen Kompartimente und EGFR wird zur Zelloberfläche zurückgeführt. Heterdimere mit anderen ErbB-Rezeptoren, insbesondere mit ErbB-2, werden wesentlich langsamer internalisiert und die Rezeptoren vermehrt zur Plasmamembran zurücktransportiert, so dass die Wirkung mitogener Signale verstärkt wird (Carpenter, 2000; Lenferink et al., 1998; Worthylake et al., 1999).

Signalkaskaden Je nach gebundenen Adapter- und Effektorproteinen werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet. Am Ende der Signalkaskaden steht die Steigerung der Translation und Transkription von Genen, deren Produkte die Zellproliferation und das Zellwachstum sowie die Migration und die Angiogenese fördern und die Apoptose verhindern (Olayioye et al., 2000).

Die Mitogen activated protein kinase (MAPK)-Signalkaskade gehört zu den Signalkaskaden, die durch EGFR aktiviert werden. Über Zwischenstufen werden verschiedene MAP-Kinasen stimuliert. Dazu zählen u.a. die Extracellular regulated kinase 1 und 2 (ERK1 und 2), p38 sowie die Jun N-terminal kinase (JNK) (Prenzel et al., 2001). Die Transkriptionsfaktoren ERK1 und 2 beispielsweise werden durch Phosphorylierung aktiviert und gelangen als Dimer in den Zellkern. Dort aktivieren sie die Transkriptionsfaktoren c-myc, Elk-1 und c-fos, die in Proliferations- und Wachstumsprozessen involviert sind (Cobb, 1999).

Auch die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) wird durch EGFR aktiviert. Die regulatorische Untereinheit bindet über ein zwischengeschaltetes Protein an EGFR. Die katalytische Untereinheit ermöglicht daraufhin die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-phosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-phosphat (PIP3), das Proteine mit PH-Domänen zur Zellmembran rekrutiert und aktiviert. Zu diesen zählt die Serin-Threoninkinase Akt. Akt wirkt antiapoptotisch, in dem es verschiedene, an der Apoptose beteiligte Proteine phosphoryliert und inaktiviert. Akt hemmt indirekt den Inhibitor von NF- κ B, um so die NF- κ B vermittelte Genexpression zu unterstützen. Weiterhin inaktiviert Akt die Glykogensynthasekinase 3 und verhindert damit den Abbau von Cyclin D1 und c-myc. Dadurch wird das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase begünstigt (Kandel und Hay, 1999; Prenzel et al., 2001; Vivanco und Sawyers, 2002).

Die Phospholipase C (PLC) bindet mit einer SH-Bindungsdomäne an EGFR und wird aktiviert. Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-(4,5)-phosphat (PIP2) zu Inositol-(1,4,5)-phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 vermag Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen

Retikulum freizusetzen und dadurch Enzyme zu aktivieren. DAG dagegen aktiviert die Proteinkinase C und damit indirekt den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Wahl und Carpenter, 1991).

Auch die Transkriptionsfaktoren der Signal transducers and activators of transcription (STAT)-Familie sind Substrate des EGFR und werden durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes aktiviert. Sie werden als aktive Dimere in den Zellkern transloziert und stimulieren nach Bindung an spezifische DNA-Elemente die Gentranskription (Bromberg et al., 1999; Egloff und Grandis, 2008).

Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor in malignen Tumoren Eine erhöhte Aktivität des EGFR wurde in verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen, wozu auch orale Plattenepithelkarzinome gehören. Die übermäßige Aktivierung des EGFR geht einher mit erhöhter Proliferation, Angiogenese sowie Migration, Invasion und Metastasierung. Apoptosemechanismen werden unterdrückt (Arteaga, 2002; Harari, 2004). Die Aktivitätssteigerung kann aus einer erhöhten Genexpression von EGFR, aus Genmutationen mit dauerhafter Aktivierung des Rezeptors oder aus autokrinen Stimulationsmechanismen bei Coexpression von Wachstumsfaktorgen resultieren (Prenzel et al., 2001).

Ursache einer Überexpression sind meist Genamplifikationen, aber auch Promoteralterationen oder intragenetische Mutationen kommen vor (Salomon et al., 1995; Shintani et al., 1999). Dabei korreliert die erhöhte Genexpression von EGFR in epidermalen Plattenepithelkarzinomzellen mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit sowie mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie und somit einer schlechten Prognose (Grandis et al., 1998; Merlano und Occelli, 2007). In Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches lassen sich erhöhte Genexpressionsraten von EGFR nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in dysplastischen Geweben und in histologisch normaler Mukosa nachweisen. Dies erlaubt einerseits auf ein frühes Ereignis in der Tumorgenese zu schließen und könnte andererseits die hohe Inzidenz von sekundären Primärtumoren im oberen Aerodigestivtrakt bei diesen Patienten erklären (Ang et al., 2004; Grandis et al., 1998).

Mutationen im Sinne von Deletionen konnten in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden, insbesondere in Glioblastomen, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, Mammakarzinomen sowie in Ovarialkarzinomen. Die Deletionen treten innerhalb der die extrazelluläre N-terminale oder die intrazelluläre C-terminale Domäne kodierenden Genabschnitte auf und führen zu einer ligandenunabhängigen und damit konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. Der am besten charakterisierte und häufigste Mutant des EGFR in humanen Tumorerkrankungen ist der EGFR VIII. Diesem Rezeptor fehlen die Exons 2 bis 7 sowie die Aminosäuren 6 bis 273 (801bp) in der extrazellulären Domäne (Prenzel et al., 2001; Voldborg et al., 1997).

Auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches kommt dieser trunkierte Rezeptor vor (Gold et al., 2009).

Dauerhafte Aktivierung des EGFR geht häufig einher mit autokriner Stimulation und Coexpression von Rezeptor und Wachstumsfaktor (Arteaga, 2002).

Auch das Gen der Rezeptortyrosinkinase ErbB-2 ist ein Protoonkogen, dessen erhöhte Expression in Tumoren mehrfach nachgewiesen werden konnte. Die Bildung von Heterodimeren mit ErbB-2 verstärkt die Rezeptorfunktion, und zwar durch erhöhte Bindungsaffinität zu Liganden, verminderte Dissoziation der Liganden, Rücktransport der endozytierten Rezeptoren an die Zelloberfläche und ein breiteres Spektrum an Signalmolekülen und -kaskaden (Jones et al., 1999; Karunagaran et al., 1996; Worthylake et al., 1999). Der ErbB-2 besitzt außerdem eine außergewöhnlich hohe Tyrosinkinaseaktivität (Tzahar et al., 1996).

Auch Komponenten der intrazellulären Signalkaskaden des EGFR können in Tumorerkrankungen fehlreguliert sein. Negative Feedbackschleifen beispielsweise sind in Tumorzellen inaktiv. In verschiedenen humanen Tumoren wurden Mutationen nachgewiesen, die die Proteinkinase Akt und die katalytische Untereinheit der PI3K aktivieren (Egloff und Grandis, 2008). Nicht zuletzt können auch Mutationen in einem der Ras-Gene, HRas, NRas oder KRas, zu dauerhafter Stimulation der MAPK-Signalkaskade führen und wurden in vielen humanen Tumoren nachgewiesen (Montagut und Settleman, 2009).

1.1.5.2 Defensine

Defensine sind positiv geladene antimikrobielle Peptide mit einem Molekulargewicht von 3 bis 5 kDa (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985). Sie sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und zeigen in vitro ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, einige Pilze und lipidumhüllte Viren (Daher et al., 1986; Ganz et al., 1985; Harder et al., 1997; Joly et al., 2004; Quiñones-Mateu et al., 2003).

Defensine besitzen 29 bis 42 Aminosäuren und weisen als gemeinsames Strukturmerkmal eine dreisträngige antiparallele β -Faltblattstruktur auf, die durch drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen sechs Cysteinresten stabilisiert wird (Hill et al., 1991; Hoover et al., 2000; Zimmermann et al., 1995). Aufgrund von Unterschieden in der Primärstruktur und der Anordnung der Disulfidbrücken werden α - und β -Defensine unterschieden. Beim Menschen sind sechs α -Defensine und vier β -Defensine charakterisiert worden, wobei wahrscheinlich weitere Gene der humanen β -Defensine existieren (Schutte et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002).

Die antimikrobielle Wirkung der Defensine beruht auf ihrer Fähigkeit zur Destruktion von Membranstrukturen. Diese kommt durch ihre positive Ladung und amphipathische Struktur

mit polaren und hydrophilen Oberflächen zustande. Die Defensine binden zunächst an die zytoplasmatische Membran von Mikroorganismen – unter dem Einfluss des Transmembranpotentials und elektrostatischer Kräfte. Sie inserieren und aggregieren in der Membran zu multimeren Poren oder spannungsabhängigen Kanälen (Fujii et al., 1993; Hill et al., 1991; Kagan et al., 1990). Als weiterer Wirkmechanismus sind elektrostatische Wechselwirkungen, ähnlich einem Detergens, zwischen den positiv geladenen Defensinen und der negativ geladenen Ziellmembran beschrieben, die zur Membranpermeabilisation führen (Hoover et al., 2000).

α -Defensine Die α -Defensine DEFA1 bis DEFA4 sind in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten lokalisiert und stehen diesen als Teil der nicht-oxidativen Abwehr bereit (Ganz et al., 1985; Wilde et al., 1989). Auch in Monozyten und natürlichen Killerzellen wurden DEFA1 bis DEFA4 gefunden. Sie wirken entweder intrazellulär nach Fusion der Granula mit Phagolysosomen oder werden nach extrazellulär abgegeben. Die α -Defensine werden konstitutiv im Knochenmark in den Promyelozyten und Myelozyten, Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten, gebildet (Arnljots et al., 1998; Valore und Ganz, 1992). In den Panethzellen des Dünndarms sowie in Epithelzellen des weiblichen Urogenitaltraktes kommen zwei weitere α -Defensine, HD-5 und HD-6, vor (Jones und Bevins, 1992, 1993; Quayle et al., 1998).

Neben antimikrobiellen Eigenschaften besitzen DEFA1 und DEFA2 chemotaktische Wirkung auf CD8⁺ und naive CD4⁺ T-Lymphozyten, Monozyten und unreife dendritische Zellen (Chertov et al., 1996; Territo et al., 1989; Yang et al., 2000). Sie stimulieren außerdem die Degranulation von Mastzellen mit Sekretion von Histamin und regulieren die Komplementaktivierung (Befus et al., 1999; Prohászka et al., 1997). Dadurch sind angeborenes und erworbenes Immunsystem miteinander verbunden.

Die α -Defensine besitzen darüber hinaus konzentrationsabhängig eine zytotoxische Wirkung auf eukaryotische Zellen (Lundy et al., 2004).

β -Defensine Humane β -Defensine werden in verschiedenen epithelialen Geweben synthetisiert. Die Synthese des humanen β -Defensins 1 (hBD-1) ist in Niere, Pankreas und weiblichem Reproduktionstrakt, aber auch in Darm, Respirationstrakt und Keratinozyten der Gesichtshaut nachgewiesen (Bensch et al., 1995; Fulton et al., 1997; Goldman et al., 1997; O’Neil et al., 1999; Valore et al., 1998). In der Mundhöhle wird hBD-1 in Epithelzellen der Speicheldrüsen, Zunge, Gingiva und bukkalen Mukosa gebildet (Bonass et al., 1999; Dunsche et al., 2001; Krisanaprakornkit et al., 1998; Sahasrabudhe et al., 2000). Die Genexpression erfolgt konstitutiv. Zusätzlich kann die Synthese von hBD-1 in Keratinozyten und oralen Epithelzel-

len durch mikrobielle Stimuli sowie durch Mitbeteiligung von Lymphozyten und Monozyten stimuliert werden (Sahasrabudhe et al., 2000; Sørensen et al., 2005; Vankeerberghen et al., 2005).

Im Gegensatz zur ubiquitären Synthese von hBD-1 werden das humane β -Defensin 2 (hBD-2) und das humane β -Defensin 3 (hBD-3) vorwiegend in Keratinozyten der Gesichtshaut sowie in Epithelzellen der Mundhöhle und des Respirationstraktes gebildet (Bals et al., 1998; Dunsche et al., 2002; Harder et al., 1997). Die Synthese wird durch kommensale und pathogene Mikroorganismen sowie durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α induziert. Ohne entzündliche oder mikrobielle Stimuli ist die Synthese gering oder nicht nachweisbar (García et al., 2001b; Harder et al., 2000, 2001; Liu et al., 2002). Die Genexpression von hBD-2 wird je nach Gewebe und Stimuli über verschiedene Signalkaskaden reguliert. Eine Mitbeteiligung von Toll-like-Rezeptoren wird diskutiert (Froy, 2005). Die Promoterregion des hBD-2-Gens besitzt mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Harder et al., 2000; Liu et al., 1998). In Darmepithel und Trachea ist die Aktivierung von NF- κ B involviert, in gingivalen Epithelzellen spielen möglicherweise die MAPK-Signalkaskade und das Activating enhancer binding protein 1 (AP-1) eine Rolle bei der Genexpression (O’Neil et al., 1999; Becker et al., 2000; Krisanaprakornkit et al., 2002). In Keratinozyten konnte eine Genexpressionssteigerung von hBD-3 über die Transaktivierung von EGFR nachgewiesen werden (Sørensen et al., 2003, 2005).

HBD-1 wirkt gegen gramnegative Bakterien und begrenzt gegen grampositive Bakterien, nicht jedoch gegen Pilze und Viren (Valore et al., 1998). Die antimikrobielle Wirkung ist im Vergleich zu hBD-2 und -3 gering. Jedoch weist hBD-1 eine starke zytotoxische Wirkung auf humane Zellen auf (Donald et al., 2003). HBD-2 besitzt einen bakteriziden Effekt auf gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, antimykotisches Potenzial gegen *Candida albicans* und einen schwachen bakteriostatischen Effekt auf grampositive Bakterien (Bals et al., 1998; Harder et al., 1997; Liu et al., 2002). Im Vergleich zu hBD-1 und -2 zeigt hBD-3 ein breiteres Wirkungsspektrum gegenüber pathogenen Mikroorganismen und eine effektivere antimikrobielle Aktivität (Joly et al., 2004).

Auch humane β -Defensine stellen eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem her. Studien, die die chemotaktische Rolle der humanen Defensine thematisieren, kommen jedoch zu kontroversen Ergebnissen. Yang et al. zeigten chemotaktische Aktivität von hBD-1 und -2 auf unreife dendritische Zellen und CD4⁺ T-Gedächtniszellen. Die immunmodulatorische Wirkung führten sie auf eine Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR6 auf Zellen der adaptiven Immunabwehr zurück (Yang et al., 1999). Niyonsaba et al.

fanden eine zusätzliche chemotaktische Wirkung von hBD-2 auf neutrophile Granulozyten (Niyonsaba et al., 2004). HBD-3 rekrutiert ferner Monozyten als Zellen der angeborenen Immunantwort zum Infektionsort (García et al., 2001a; Wu et al., 2003). Soruri et al. dagegen fanden eine chemotaktische Wirkung der humanen hBD-1 bis -4 auf Makrophagen und Mastzellen, nicht aber auf T-Gedächtniszellen oder dendritische Zellen. Ferner konnten sie keine funktionelle Beteiligung des Rezeptors CCR6 bestätigen (Soruri et al., 2007).

Defensine in Tumoren Veränderte Expressionsmuster der Gene der humanen β -Defensine konnten in verschiedenen epithelialen Tumoren nachgewiesen werden. Ein tumorspezifischer Verlust oder zumindest eine Verminderung der Genexpression von hBD-1 wurde sowohl in oralen Plattenepithelkarzinomen als auch in Nieren- und Prostatakarzinomen sowie in Basalzellkarzinomen nachgewiesen (Donald et al., 2003; Gambichler et al., 2006; Wenghoefer et al., 2008a). In pleomorphen Adenomen wurde neben einer verminderten Genexpression von hBD-1 außerdem eine Verlagerung des hBD-1-Proteins aus dem Zytoplasma in den Nukleus der Tumorzellen vorgefunden (Pantelis et al., 2009). Auch in malignen Speicheldrüsentumoren konnte eine Translokation des hBD-1-Proteins in den Nukleus der Tumorzellen gezeigt werden (Wenghoefer et al., 2008b). Hier wird diskutiert, ob das hBD-1-Gen möglicherweise als Tumorsuppressorgen fungiert. Eine Beteiligung an der Transkriptionskontrolle und der Induktion der Apoptose in epithelialen Tumoren wird vermutet. Polymorphismen des Promoters wie Punktmutationen oder Autoregulation des Promoters durch Akkumulation von hBD-1 im Zellkern könnten zur Verminderung oder zum Verlust der Genexpression von hBD-1 führen (Sun et al., 2006; Wenghoefer et al., 2008b). Gesteigerte Genexpression von hBD-1 kann umgekehrt Wachstum und Ausbreitung von Prostata-Tumorzellen vermindern oder verhindern (Bullard et al., 2008). Während exogen zugeführtes, synthetisches hBD-1 die Proliferation von renalen Tumorzellen verhinderte, führte endogene Überexpression des hBD-1-Gens in Tumorzellen zu Caspase-3-vermittelter Apoptose (Sun et al., 2006).

Im Gegensatz zu hBD-1 konnte für hBD-2 eine erhöhte Genexpressionsrate in Zellen gut differenzierter oraler Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden (Sawaki et al., 2002). Die Genexpression scheint dabei mit dem Differenzierungsgrad und der Keratinisierung der Plattenepithelkarzinomzellen zu korrelieren (Mizukawa et al., 2000; Abiko et al., 2001).

In einer Reihe von Tumoren, wie beispielsweise in oralen Plattenepithelkarzinomen der Zunge, konnten humane α -Defensine nachgewiesen werden. In erster Linie stammen die in Tumoren nachgewiesenen humanen α -Defensine aus infiltrierenden neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und werden in Körperflüssigkeiten wie den Speichel sezerniert. Es konnte jedoch auch die Genexpression in Tumorzellen selbst gezeigt werden (Droin et al., 2009). Dazu gehö-

ren die Zelllinien eines Nierenkarzinoms, in denen die humanen α -Defensine möglicherweise Tumorzellproliferation und Immunerkennung der Tumorzellen durch T-Zellen beeinflussen (Müller et al., 2002).

1.1.5.3 S100 Proteine

Die Familie der S100 Proteine besteht aus 25 eng miteinander verwandten Proteinen mit einem Molekulargewicht von 9–13 kDa. Die Gene sind überwiegend auf Chromosom 1q21 lokalisiert, u.a. im epidermalen Differenzierungskomplex (Sapkota et al., 2008). Neben strukturellen und evolutionären Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die S100 Proteine hinsichtlich intrazellulärer Lokalisation, Genexpression und Transkriptionskontrolle (Fernandez-Fernandez et al., 2005).

Als gemeinsames Strukturmerkmal besitzen S100 Proteine zwei Calcium-bindende Helix-Loop-Helix-Motive (EF-Hand), eine zentrale Scharnierregion variabler Länge sowie eine C- und N-terminale Domäne. Die C-terminale Domäne variiert unter den S100 Proteinen und ist vermutlich für die selektive Bindung spezifischer Zielproteine verantwortlich. Intrazellulär bilden die S100 Proteine antiparallele Hetero- und Homodimere. Die Bindung von Calciumionen löst eine Konformationsänderung aus, die die Bindung eines Zielproteins im Bereich der C-terminalen Domäne erlaubt. Es entsteht ein Heterotetramer aus zwei S100 Proteinen und zwei Zielproteinen (Eckert et al., 2004).

Die S100 Proteine sind an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse und Signaltransduktionswege beteiligt, die u.a. Proteinphosphorylierung, Zellwachstum, Zellzyklusregulation, Transkription, Differenzierung und Apoptose betreffen. Die meisten dieser Prozesse sind Calcium-abhängig. Außerdem werden einige S100 Proteine nach extrazellulär sezerniert und beeinflussen dort neuronales Wachstum und Leukozytenchemotaxis (Sapkota et al., 2008).

S100A7 S100A7 ist im Zytoplasma und Zellkern von epidermalen Basalzellen sowie in der Zellperipherie nahe der Plasmamembran von epidermalen Stachelzellen lokalisiert. Außerdem wird S100A7 teilweise in den Extrazellulärraum sezerniert (Broome et al., 2003). Die Genexpression in Keratinozyten kann induziert werden durch Retinolsäure, Calcium, UV-Licht, DNA-schädigende Substanzen, Verlust der Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix sowie durch Wachstumsfaktorentzug. Außerdem korreliert die Genexpression mit dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten (Zhou et al., 2008). Auch in oralen epithelialen Zellen der Gingiva und der Zunge konnte die Genexpression von S100A7 demonstriert werden (Eberhard et al., 2008; Meyer et al., 2008).

S100A7 zeigt chemotaktische Wirkung auf CD4⁺ Lymphozyten und neutrophile Granulozy-

ten (Jinquan et al., 1996). Außerdem besitzt S100A7 antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* (Gläser et al., 2005).

Erhöhte Genexpression von S100A7 ist in psoriatischem Gewebe sowie verschiedenen anderen entzündlichen und hyperproliferativen Erkrankungen der Epidermis nachweisbar, u.a. in atopischer Dermatitis und entzündlichem Lichen sclerosus und atrophicus. Auch in epithelialen oralen Tumoren sowie in Plattenepithelkarzinomen der Gesichtshaut, wurde eine erhöhte Genexpression von S100A7 gefunden (Eckert et al., 2004; Zhou et al., 2008).

Erhöhte Genexpression korrelierte mit nicht invasivem Wachstum, einem hohen Differenzierungsgrad und einem frühen Tumorstadium, so dass postuliert wird, dass S100A7 die Funktion eines Tumorsuppressors innehat (Zhou et al., 2008). Die erhöhte Genexpression in prämaligen und hoch differenzierten Plattenepithelkarzinomen ist vermutlich als initialer Abwehrmechanismus zu verstehen: S100A7 verhindert Tumorzellproliferation *in vitro*, fördert Zelldifferenzierung und unterdrückt Tumorstadium und Invasion *in vivo*. Dies wird beispielsweise über die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade sowie die Expression des β -Catenin-Zielproteins c-myc vermittelt. Umgekehrt können aber auch β -Catenin-Signale die Genexpression von S100A7 verhindern. Wenn im Laufe der Tumorgenese durch aktivierte β -Catenin-Signale oder andere unbekannte Mechanismen die erhöhte Genexpression von S100A7 verloren geht, werden Tumorstadium und Invasion entfesselt. Dementsprechend lag verminderte oder keine Genexpression in gering differenzierten, fortgeschrittenen und invasiven Plattenepithelkarzinomen vor (Kesting et al., 2009; Zhou et al., 2008).

S100A4 S100A4 kann in Haarfollikelzellen nachgewiesen werden, im Gegensatz zu S100A7 jedoch nicht in epidermalen Basalzellen. S100A4 wird ebenso wie S100A7 nach extrazellulär sezerniert (Boye et al., 2008; Uozumi et al., 2000).

In verschiedenen Tumoren wie Ösophagus-, Kolon- und Mammakarzinomen und auch in oralen Plattenepithelkarzinomen ist eine erhöhte Genexpression von S100A4 nachweisbar. Die Genexpression korreliert mit verstärkter Metastasierung und Invasion, reduzierter Expression von E-Cadherin und schlechter Prognose (Moriyama-Kita et al., 2004).

S100A4 beeinflusst tumorspezifische Funktionen wie Tumorzellmotilität, Apoptose und Angiogenese durch Wechselwirkung mit verschiedenen intra- und extrazellulären Proteinen sowie die Genexpression von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren (Elenjord et al., 2008). Durch Bindung an das Tumorsuppressorprotein p53 inhibiert S100A4 die Bildung von Tetrameren und beeinflusst dadurch die intrazelluläre Lokalisation von p53-Protein und dessen Aktivität (Fernandez-Fernandez et al., 2005; Grigorian et al., 2001; Kesting et al., 2009). Extrazelluläres S100A4 aktiviert in einigen Tumorzelllinien außerdem den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der in Tumorstadium und -metastasierung involviert ist, sowie die JNK, deren

Aktivierung zur Stimulation des programmierten Zelltodes führt (Boye et al., 2008).

Die Regulation der Genexpression von S100A4 ist ein komplexer Mechanismus, der nur in Teilen verstanden ist. Beteiligt zu sein scheint hierbei der Methylierungszustand der DNA. Bei Hypomethylierung wurde eine erhöhte, bei Hypermethylierung eine verminderte Genexpression von S100A4 gefunden (Uozumi et al., 2000).

1.1.5.4 Doc-1

Das Tumorsuppressorgen Deleted in oral cancer-1 (Doc-1) kodiert ein aus 115 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Seine verminderte oder fehlende Expression wurde in verschiedenen Tumorerkrankungen, auch in oralen Plattenepithelkarzinomen, nachgewiesen. Das synthetisierte Polypeptid blockiert den Zellzyklus in der G1-Phase und verhindert so die DNA-Replikation. Die Wirkung erfolgt durch direkte Wechselwirkung mit der DNA-Polymerase- α :Primase oder durch Verhinderung der CDK2-vermittelten Phosphorylierung der Primase. Dazu bindet das Peptid spezifisch an die monomere, inaktive Form der CDK2 und führt die aktive Form der CDK2 der Proteolyse zu (Shintani et al., 2000, 2001). Die Expression von Doc-1 erfolgt in normalen oralen Keratinozyten vermutlich zellzyklusabhängig, mit der höchsten Expressionsrate in der S-Phase. Reduzierte Expression in oralen Tumorerkrankungen korreliert mit erhöhter Invasivität, erhöhtem Risiko an Lymphknotenmetastasen und reduzierter 10-Jahres-Überlebensrate.

1.1.5.5 Ki67

Ki67 ist ein Zellkernprotein, das ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Die Genexpression von Ki67 nimmt von der späten G1-Phase bis zur G2-Phase stetig zu. In der Mitosephase wird eine maximale Genexpressionsrate erreicht. Nach Beendigung der Mitosephase nimmt die Nachweisbarkeit von Ki67 jedoch wieder ab (Gerdes et al., 1984; Sasaki et al., 1987). In einer Zelle, die den Zellzyklus verlässt und in die Ruhe- oder Differenzierungsphase eintritt, wird das Antigen Ki67 abgebaut und nicht neu synthetisiert. Tritt diese Zelle jedoch wieder in den Zellzyklus ein, so wird Ki67 ab der späten G1-Phase erneut nachweisbar. Neben der Genexpressionsrate variiert während des Zellzyklus auch die Lokalisation von Ki67. Während der Interphase befindet sich Ki67 im Nukleus, in der Mitosephase ist Ki67 dagegen überwiegend auf den Chromosomen lokalisiert (Scholzen und Gerdes, 2000).

Antikörper gegen Ki67 werden diagnostisch als Proliferationsmarker genutzt, mit dessen Hilfe sich die Wachstumsfraktion sowohl von normalen als auch von Tumorzellen bestimmen lässt. In vielen Tumorerkrankungen besitzt die Bestimmung des prozentualen Anteils Ki67 synthetisierender Zellen prognostische Aussagekraft. Die erhöhte Genexpression von Ki67 korreliert

in oralen Plattenepithelkarzinomen mit einem geringen Differenzierungsgrad, erhöhter Invasivität und fortgeschrittenem Tumorstadium (Rittà et al., 2009; Vieira et al., 2008).

1.1.6 Therapie

In Abhängigkeit des prätherapeutischen Tumorstagings nach der TNM-Klassifikation wird das therapeutische Vorgehen gewählt. Grundsätzlich gilt im Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) die radikale Operation als Therapie erster Wahl (Howaldt et al., 2000). Ziel ist die vollständige Entfernung des Primärtumors im Block mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm im Gesunden. Die Tumorresektion wird mit einer elektiven ein- oder beidseitigen Neck Dissection kombiniert, bei der die Halslymphknoten in Level I bis III ausgeräumt werden. Bei präoperativ suspektem Lymphknotenbefund oder positivem intraoperativem Befund werden die Lymphknoten in Level I bis V entfernt (Rasse, 2008; Schultze et al., 2006).

In den Tumorstadien I und II wird die radikale Operation alleine oder in Kombination mit einer Radiotherapie durchgeführt. Indikationen für eine postoperative Radiotherapie sind R1- und R2-Resektionen, wenn keine Möglichkeit zur kurativen R0-Resektion besteht, Lymphknotenmetastasen pN2 oder pN3 sowie die Primärtumorausdehnung pT4.

Zur Therapie lokal fortgeschrittener Tumoren in den Stadien III bis IV B empfiehlt der DÖSAK eine präoperative Radio-Chemotherapie und eine anschließende Radikaloperation des Primärtumors und der regionären Halslymphknoten. Die Radiotherapie erfolgt perkutan und umfasst eine Gesamtdosis von 36 Gy. Die tägliche Einzeldosis beträgt 2 Gy bei einer konventionellen Fraktionierung von 5 x 2 Gy pro Woche. Im Rahmen der begleitenden Chemotherapie stehen Substanzen wie Methotrexat, Cisplatin, Carboplatin, Bleomycin und 5-Fluorouracil als Einzelsubstanzen oder als Kombinationstherapien zur Verfügung. Die anschließende Operation erfolgt 2 bis 3 Wochen nach Beendigung der präoperativen Radio-Chemotherapie. Bei einer R1-Resektion, Lymphknotenmetastasen pN2 oder Lymphknoten-kapseldurchbruch wird die Radiotherapie bis zur Dosis von 66 bis 70 Gy fortgeführt (Schultze et al., 2006).

Patienten im Stadium IV C sowie Rezidive werden mit chemotherapeutischen Maßnahmen palliativ behandelt. Eine kurative Chemotherapie von oralen Plattenepithelkarzinomen steht bisher nicht zur Verfügung (Reuther et al., 2006).

Darüberhinaus sind Chemotherapeutika entwickelt worden, die mit der Tumorgenese assoziierte Signalkaskaden blockieren sollen. Im Mittelpunkt steht dabei die Blockade des EGFR sowie der Komponenten seiner Signaltransduktionswege durch monoklonale Antikörper

und Tyrosinkinaseinhibitoren (Gold et al., 2009). Die monoklonalen Antikörper binden an die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne, induzieren die Endozytose des entstandenen Komplexes und verhindern so die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden. Cetuximab ist bisher als einziger monoklonaler Antikörper zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen klinisch zugelassen. Cetuximab ist in lokal oder regional fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches zur Kombination mit radiotherapeutischen Maßnahmen indiziert. In rezidivierenden und/oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen wird Cetuximab mit konventionellen Chemotherapeutika kombiniert. In Plattenepithelkarzinomen dagegen, die gegenüber konventionellen Chemotherapeutika refraktär sind, stellt Cetuximab eine wichtige monotherapeutische Maßnahme dar (Gold et al., 2009). Tyrosinkinaseinhibitoren binden an die intrazelluläre Mg-ATP-Bindungsstelle und verhindern dadurch die Autophosphorylierung und die Aktivierung der Tyrosinkinase des EGFR (Harari, 2004). Die am weitentwickeltsten, aber noch nicht zur therapeutischen Anwendung bereitstehenden Tyrosinkinaseinhibitoren sind Gefitinib und Erlotinib. Auch duale Tyrosinkinaseinhibitoren, die sowohl den EGFR als auch den ErbB-2 blockieren, werden zur klinischen Anwendung geprüft (Gold et al., 2009).

1.1.7 Prognose

Die Prognose der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom ist primär abhängig vom Tumorstadium nach der TNM-Klassifikation. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten im Stadium I und II etwa 80 % erreicht, reduziert sie sich in lokal fortgeschrittenen Stadien (III bis IV B) auf etwa 50 %. Patienten, die Metastasen und/oder Rezidive aufweisen, besitzen eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur etwa 25 %. Tumorrezidive treten bei etwa 50 % der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom auf (Gold et al., 2009).

Ein Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Prognose wird diskutiert. Desweiteren haben Tumorgröße, R0-Resektion sowie der Nachweis vitaler Tumorzellen in Lymphknoten und im Tumorsektat einen prognostisch signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate (Reuther et al., 2006; Walker et al., 2003). Auch den Expressionen von verschiedenen Tumorsuppressorgenen und Onkogenen und den Konzentrationen der dann translatierten Proteine wird eine prognostische Aussagekraft zugesprochen. Erhöhte Genexpression des EGFR beispielsweise wird mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium und damit einer schlechten Prognose korreliert (Merlano und Occelli, 2007).

Das Auftreten von multiplen Primärtumoren im Respirations- und oberen Verdauungstrakt als Folge der Feldkanzerisierung trägt wesentlich zum Therapiemisserfolg von Plattenepithelkarzinomen im Gesichts- und Halsbereich bei (Bongers et al., 1996; Rautava et al., 2008).

1.2 Fragestellung

Orale Plattenepithelkarzinome stellen die häufigste maligne Tumorerkrankung der Mundhöhle dar (Mehrotra und Yadav, 2006). Weltweit wird von einer steigenden Inzidenz oraler Plattenepithelkarzinome berichtet (Reuther et al., 2006). Trotz radikaler Operation des Primärtumors sowie adjuvanter Radio- und Chemotherapie erreicht die 5-Jahres-Überlebensrate in lokal fortgeschrittenen Tumoren nur etwa 50 % (Gold et al., 2009).

Verschiedene ätiologische Faktoren, wie Tabak- und hoher Alkoholkonsum, sind an der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen beteiligt (Reichart, 2000). Diese ätiologischen Faktoren stehen in Zusammenhang mit genetischen Veränderungen innerhalb einer Zelle, die letztlich eine maligne Transformation erlauben. Eine besondere Rolle spielen dabei die Aktivierung von Protoonkogenen sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Todd et al., 2002).

Das Gen des EGFR ist als Protoonkogen mit der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen assoziiert (Grandis und Tweardy, 1993). Die erhöhte Genexpression und auch die gesteigerte Aktivität dieses Rezeptors wurden mehrfach in oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen und mit fortgeschrittenem Tumorstadium, erhöhter Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie sowie schlechter Prognose korreliert (Merlano und Occelli, 2007). Jedoch sind die molekularen Pathomechanismen der oralen Tumorgenese nur unvollständig verstanden. Möglicherweise ist die erhöhte Aktivität des EGFR mit der erhöhten Expression weiterer onkologisch relevanter Gene oder der zusätzlichen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen assoziiert.

Veränderte Genexpressionsraten in oralen Plattenepithelkarzinomen konnten auch für humane Defensine, die S100 Proteine A7 und A4 sowie für Ki67 und den Tumorsuppressor Doc-1 demonstriert werden (Moriyama-Kita et al., 2004; Rittà et al., 2009; Sawaki et al., 2002; Shintani et al., 2001; Wenghoefer et al., 2008b; Zhou et al., 2008). Parallelen zu der erhöhten Genexpression und Aktivität des EGFR existieren hinsichtlich der assoziierten Tumorcharakteristika und der funktionellen Bedeutung: Die erhöhten oder verminderten Genexpressionen wurden teilweise in Beziehung zu fortgeschrittenem Tumorstadium, Differenzierungsgrad der Tumorzellen und schlechter Prognose oraler Plattenepithelkarzinome gesetzt (Abiko et al., 2001; Elenjord et al., 2008; Kesting et al., 2009; Vieira et al., 2008). Ein Einfluss auf tu-

morspezifische Funktionen wie Apoptose, Metastasierung oder Angiogenese wird vermutet (Elenjord et al., 2008; Wenghoefer et al., 2008b; Zhou et al., 2008). Auf welche Weise die genannten Genexpressionsänderungen induziert werden, ist jedoch unklar. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zu Signalwegen des EGFR: Die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, die auch Komponenten der EGFR-Signalkaskaden sind, wird diskutiert (Liu et al., 1998; Sherman und Froy, 2008). Ein Einfluss von EGF auf die Genexpression von S100A7 und hBD-3 konnte in oralen Plattenepithelkarzinomzellen gezeigt werden (Kawsar et al., 2009; Miyazaki et al., 2006).

Ein weiteres Verstehen der molekularpathologischen Mechanismen oraler Plattenepithelkarzinome ist sowohl zur Verbesserung prognostischer Aussagen als auch für die Weiterentwicklung von Chemotherapeutika und damit letztlich für eine Erhöhung der Überlebensraten essentiell.

Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit die Expression der genannten onkologisch relevanten Gene unter dem Einfluss des EGF, einem Liganden des EGFR, untersucht werden. Hierzu sollen folgende Teilfragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist die Genexpression von DEFA1 und DEFA4 sowie von hBD-1, -2 und -3 durch EGF in der BHY-Plattenepithelkarzinomzelllinie beeinflussbar?
2. Hat die Stimulation von BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF einen Einfluss auf die Genexpression von S100A7 und S100A4?
3. Ist die Expression von Doc-1 sowie die Genexpression von Ki67 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen durch EGF beeinflussbar?
4. Wie verändert sich die Genexpression von EGF und EGFR in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen durch Stimulation mit EGF?
5. Welchen Einfluss hat die Zeitdauer der Stimulation mit EGF auf die Genexpression der genannten Zielgene in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

Die Kulturschalen (35 mm Durchmesser, 10 mm Höhe) und Zellschaber stammten von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn). Das Zellkulturmedium Ham's F12 Medium sowie die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Amphotericin waren von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cöln). Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), der Trypsininhibitor von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und das CO₂ von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) erworben. Der rekombinante humane epidermale Wachstumsfaktor (rhEGF) war von der Fa. Promokine (Heidelberg). Die BHY-Plattenepithelkarzinomzelllinie wurde von Cell Lines Service (Eppelheim) geliefert.

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht

Die BHY-Plattenepithelkarzinomzelllinie wurde kultiviert und mit dem rhEGF stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde die Gesamt-RNA aus den stimulierten Zellen isoliert und in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR) wurde anschließend die relative Genexpression von hBD-1, -2 und -3, DEFA1 und DEFA4, S100A7 und S100A4, Doc-1 und Ki67 sowie von EGF und EGFR im Vergleich zu einer nichtstimulierten Kontrolle ermittelt.

2.2.2 Kultivierung von BHY-Plattenepithelkarzinomzellen

Die verwendete BHY-Zelllinie stammt von einem gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinom eines 52-jährigen Mannes. Dieses zeigte eine lokale Invasion in den mandibulären Alveolarknochen sowie in die Mundbodenmuskulatur, wies jedoch keine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung auf (Erdem et al., 2007; Kawamata et al., 1997). Die BHY-Zelllinie wurde bereits in anderen Studien zur Untersuchung von Genexpressionsprofilen herangezogen (Erdem et al., 2008). Vor dem Hintergrund der Kenntnis des Ursprungskarzinoms und der bisherigen Untersuchung von Genexpressionsraten in BHY-Zellen wurde die Zelllinie als Vertreter von Plattenepithelkarzinomzellen auch in dieser Arbeit verwendet.

Die BHY-Plattenepithelkarzinomzellen wurden in jeweils 2 ml Zellkulturmedium, bestehend aus Ham's F12 Medium und unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum sowie von Penicillin, Streptomycin und Amphotericin, kultiviert. Die Anzüchtung der Zellen erfolgte bei 37 °C und unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂. Es wurden jeweils sechs Kulturschalen ($n = 6$) pro Zeitversuch angesetzt.

2.2.3 Stimulation von BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit rhEGF

Nach Erreichen einer Zelldichte von 80 bis 90 % Konfluenz und 16 h vor Stimulationsbeginn wurde das Nährmedium durch serumfreies Medium ersetzt.

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Genexpressionsänderungen von hBD-1, -2 und -3 bei Stimulation mit rhEGF in der Konzentration 1 ng/ml ausgeprägter sind als bei Stimulation mit rhEGF in den Konzentrationen 0,2 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml. Vor Beginn der Stimulation wurden daher zusätzlich 6 ml serumfreies Zellkulturmedium mit dem rhEGF in der Konzentration 1 ng/ml gemischt. Anschließend wurde jeweils 1 ml dieses Mediums auf die angezüchteten BHY-Plattenepithelkarzinomzellen appliziert. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde die Isolierung der Gesamt-RNA durchgeführt. Auch unstimulierte Zellen (Kontrolle) wurden der RNA-Extraktion unterzogen.

2.2.4 Extraktion der RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Protect Mini Kits“ der Fa. Qiagen (Hilden) nach dem Herstellerprotokoll. Zunächst wurde das Medium zusammen mit dem rhEGF aus den Kulturschalen aspiriert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl Lysispuffer RLT (990 µl RLT + 10 µl 2-Mercaptoethanol) lysiert und mit dem Zellschaber isoliert. Das Homogenisat wurde in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 1 Vol. 70 % Ethanol (300 µl) wurde die Probe auf eine RNeasy-Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde 500 µl RPE-Puffer appliziert und nun 2 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die auf der Säule gebundene RNA zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und 1 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Produkt aus 100 µl RNA in wässriger Lösung wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C zwischengelagert.

2.2.5 Reverse Transkription

2.2.5.1 Übersicht

Bevor die quantitative Auswertung der Genexpression mit Hilfe der RTq-PCR erfolgen konnte, musste die isolierte mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Im Rahmen der reversen Transkription binden zunächst Primersequenzen komplementär an die RNA. Das freie 3'-OH-Ende der gebundenen Primer dient nun einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der sogenannten reversen Transkriptase, als Startpunkt zur cDNA-Synthese. In der vorliegenden Studie wurden für die reverse Transkription der mRNA von β -Aktin, hBD-1, -2 und -3, DEFA1 und DEFA4 sowie von S100A7, S100A4 und Doc-1 Oligo(dT)₂₀-Sequenzen benutzt. Die reverse Transkription der mRNA von Ki67, EGF und EGFR erfolgte dagegen unter Zugabe von Randomprimern.

Die reverse Transkription und die Vervielfältigung der resultierenden cDNA im Rahmen der RTq-PCR werden in zwei getrennten Schritten vollzogen. Dadurch unterliegt die gesamte, zu untersuchende mRNA während der reversen Transkription identischen Versuchsbedingungen und potentielle Interferenzen wirken sich in gleichem Maße aus. Die cDNA kann anschließend aus einem Reservoir entnommen werden und verschiedenen Polymerasekettenreaktionsansätzen zugeführt werden (Pfaffl, 2001).

2.2.5.2 Protokoll der reversen Transkription

Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des „iScriptTM Select cDNA Synthesis Kits“ nach Herstellerangaben der Fa. Bio-Rad Laboratories (Hercules) durchgeführt. Zunächst wurde aus den aufgetauten Proben jeweils 13 μ l Gesamt-RNA entnommen, mit 2 μ l Oligo(dT)₂₀- oder Randomprimern gemischt und bei 65 °C für 5 min. inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis für 60 s wurden 4 μ l „5x iScript select reaction mix“, bestehend aus dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), MgCl₂ und Stabilisatoren, sowie 1 μ l „iScript reverse transcriptase“ (RNase H⁺ MMLV Reverse Transkriptase und RNase Inhibitorprotein) hinzugefügt, gemischt und bei 42 °C für 60 min. inkubiert. Durch weitere Inkubation bei 85 °C für 5 min. wurde die Reverse Transkriptase hitzeinaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde nun dem Ansatz der PCR zugeführt.

2.2.6 Realtime-Polymerasekettenreaktion

2.2.6.1 Übersicht

Die PCR wurde 1985 von Kary Mullis und Mitarbeitern entwickelt und ermöglicht die exponentielle Vermehrung einer spezifischen Sequenz innerhalb einer DNA (Saiki et al., 1985).

Die PCR umfasst mehrere Zyklen, die alle nach gleichem Muster ablaufen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA in der Denaturierungsphase durch Erhitzen aufgetrennt. In der folgenden Annealingphase lagern sich spezifische Primer komplementär an die zu amplifizierende Sequenz eines jeden Nukleinsäurestranges der aufgetrennten DNA an. Die optimale Annealingtemperatur ist für jeden Primer zu bestimmen. Die Elongationsphase umfasst die Synthese der komplementären DNA durch eine thermostabile Polymerase, meist die Taq-Polymerase. Als Bausteine dienen Desoxyribonukleosidtriphosphate. Die mit jedem Zyklus neu synthetisierte DNA steht im folgenden Zyklus als Matrize zur Verfügung, so dass es bei einer Effizienz von 100 % mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Produkte kommt. Es muss berücksichtigt werden, dass die Reaktion leicht störanfällig ist und die Effizienz (E) durch verschiedene Faktoren vermindert werden kann. Dazu zählen u.a. die Primersequenzen, die Konzentrationen der Reaktionspartner, potentielle Inhibitoren sowie Fehler beim Pipetieren. Stets muss versucht werden, die Reaktion hinsichtlich dieser Faktoren zu optimieren. Desweiteren geht die anfänglich exponentielle Vermehrung nach Verbrauch der Reagenzien, thermischer Enzyminaktivierung und Produkthemmung in eine Plateauphase über (Bustin, 2000; Kubista et al., 2006).

Die RTq-PCR, die erstmals von Higuchi und Mitarbeitern beschrieben wurde, ermöglicht die kontinuierliche Messung des Produktgehaltes im Verlauf der PCR (Higuchi et al., 1993). Die Detektion und Quantifizierung der amplifizierten Produkte erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Fluoreszenz proportional zur Produktmenge zunimmt. In dieser Arbeit wurde der asymmetrische Cyaninfarbstoff SYBR[®]Green I verwendet, dessen Fluoreszenz mit dem „iCycler iQ[™]“ Multicolor Realtime-PCR Detection System der Fa. Bio-Rad Laboratories (Hercules) erfasst wurde.

Der Farbstoff lagert sich sequenzunabhängig in doppelsträngige DNA ein, vorzugsweise in die kleine Furche, und erzeugt durch diese Interkalierung ein Fluoreszenzsignal. Doppelsträngige DNA entsteht in jedem Zyklus durch Primerhybridisierung und anschließende Elongation, so dass sich während dieser beiden Phasen in zunehmendem Maße Farbstoffmoleküle in die DNA einschieben und Fluoreszenz erzeugen. In der Denaturierungsphase nimmt die Fluoreszenz dagegen ab, da die DNA einzelsträngig wird und SYBR[®]Green I in Lösung geht. Die Messung der Fluoreszenz im „iCycler iQ[™]“ findet stets am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus statt (Bustin, 2000; Higuchi et al., 1993).

Doppelsträngige DNA kann auch durch Dimerisierung von Primern entstehen. Um einen Fluoreszenzanstieg durch Bindung von SYBR[®]Green I an Primerdimere oder andere un-

erwünschte Sequenzen auszuschließen und spezifische Amplifikationsprodukte nachzuweisen, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse jeder Probe erstellt. An einer für jedes Produkt spezifischen Schmelztemperatur T_m wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert und der Farbstoff freigesetzt. An dieser Temperatur nimmt die Fluoreszenzintensität daher abrupt ab. Die Schmelztemperatur eines Produktes ist abhängig von dessen Länge und Sequenz. Primerdimere besitzen typischerweise eine geringere Länge und damit einen niedrigeren Schmelzpunkt und sind so von den spezifischen Produkten abgrenzbar (Deprez et al., 2002; Kubista et al., 2006; Ririe et al., 1997).

Während der initialen Zyklen ist das Fluoreszenzsignal noch schwach und kann nicht von der Hintergrundfluoreszenz abgegrenzt werden. Mit zunehmender Zyklusanzahl, d.h. mit zunehmender Produktmenge, steigt die Fluoreszenz jedoch an und liegt erstmals am sogenannten Crossingpoint, dem Fluoreszenzschwellenwert, statistisch signifikant über der Hintergrundfluoreszenz und damit über der Nachweisgrenze. Die Anzahl an Zyklen, die in einer PCR durchlaufen werden, um diesen Schwellenwert zu erreichen, ist abhängig von der Ausgangsmenge an cDNA und wird als C_t -Wert oder threshold cycle bezeichnet. Je höher die Menge der cDNA zu Reaktionsbeginn, umso weniger Zyklen sind zum Erreichen des Fluoreszenzschwellenwertes notwendig. Bei einer Effizienz von 100 % entspricht ein um eine Einheit geringerer C_t -Wert der doppelten Menge an ursprünglicher cDNA (Pfaffl, 2004).

Der C_t -Wert wird stets in der exponentiellen Phase der PCR gemessen (Gibson et al., 1996). Da die Hintergrundfluoreszenz aber, durch unterschiedliche Versuchsbedingungen beeinflusst, keinen konstanten Wert besitzt, variiert auch der Schwellenwert und wird willkürlich zu Versuchsbeginn festgelegt. Ausschließlich C_t -Werte, die sich auf den gleichen Schwellenwert beziehen, sind vergleichbar (Bustin, 2000).

2.2.6.2 Primersequenzen

Die Primer wurden manuell in der Gensequenz bestimmt und auf Sequenzidentität und Spezifität durch Eingabe in das BLAST-System des National Center of Biotechnology Information (USA) analysiert. Alle Primer waren vollständig identisch mit der Sequenz der mRNA und zeigten keine oder vernachlässigbare Kreuzhomologien zu anderen humanen Gensequenzen.

Die Anforderungen an die Sequenz der verwendeten Primer sind in erster Linie, keine Dimere in der PCR zu bilden und eine optimale Effizienz, also eine optimale Vervielfachungsrate des Produktes je Zyklus zu erlauben, idealerweise eine Verdopplung der cDNA in jedem Zyklus. Um sich diesen Anforderungen anzunähern, muss für jeden Primer eine Temperatur ermittelt werden, bei der die Annealing- und Elongationsphase optimiert verlaufen (Bustin et al., 2005). Diese Temperatur wurde in dieser Studie anhand eines Temperaturgradienten

bestimmt.

Die ermittelten Primersequenzen und ihre zugehörigen Temperaturoptima sind der Tabelle 1 auf Seite 39 zu entnehmen.

2.2.6.3 Protokoll der Realtime-Polymerasekettenreaktion

Zur Durchführung der quantitativen Genexpressionsanalyse wurde für jede der zu untersuchenden Proben der folgende Reaktionsansatz zusammengestellt:

1 µl	cDNA
0,123 µl	Primer (je 100 pmol/µl)
11,375 µl	Wasser
12,5 µl	iQ TM SYBR®Green Supermix

Um eine fehlerhafte Zusammensetzung dieser Substanzen durch ungenaues Pipettieren zu minimieren, wurde zunächst ein Mastermix aus dem iQTMSYBR®Green Supermix, Wasser und Primern vorbereitet.

Die PCR wurde in dem Thermocycler iCycler® der Fa. Bio-Rad Laboratories (Hercules) durchgeführt. Im ersten Zyklus erfolgte eine Denaturierungsphase bei 95 °C über eine Dauer von 6 min., um Sekundärstrukturen aufzulösen und die Taq-Polymerase zu aktivieren. In den folgenden Zyklen beanspruchte die Denaturierungsphase zur Auftrennung doppelsträngiger DNA bei 95 °C jeweils 15 s. Die Primerhybridisierung erfolgte je nach Primer bei 65 °C bis 69 °C über 30 s. Die Elongationsphase dauerte 30 s und erfolgte bei einer Temperatur von 72 °C. Insgesamt wurden 50 Zyklen durchlaufen.

Die Detektion der amplifizierten Genprodukte über Fluoreszenzmessung erfolgte von Zyklus zu Zyklus. Anhand der gemessenen Fluoreszenzwerte und der Anzahl der Zyklen wurde durch die Software eine Amplifikationskurve aufgezeichnet und der jeweilige C_t-Wert bestimmt. In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben von 55 °C auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenzänderung kontinuierlich gemessen. Die erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Temperatur zeigte die abrupte Fluoreszenzabnahme an der Schmelztemperatur T_m der Zielsequenz und erlaubte damit die Identifizierung der Zielsequenz. Ein zweiter Schmelzpeak wurde nicht verzeichnet.

Jede Versuchsreihe bestand außer dem Reaktionsansatz mit der jeweiligen Probe aus einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle. Die Negativkontrolle enthielt 1 µl Wasser statt der Probe aus 1 µl cDNA. Hier war kein Amplifikationsprodukt nachweisbar.

2.2.6.4 Referenzgene

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsrate der zu untersuchenden Zielsequenz in Beziehung zu der Expressionsrate eines oder mehrerer Referenzgene gesetzt, d.h. die Expressionsergebnisse werden normalisiert. Das Referenzgen wird auch als interner Standard bezeichnet. Es handelt sich häufig um sogenannte Haushaltsgene, die ubiquitär, d.h. in allen kernhaltigen Zellen, und konstant exprimiert werden. Das Gen von β -Aktin, ein Strukturprotein des Zytoskeletts, wird häufig zu diesem Zweck herangezogen. Methodische Fehler, die beispielsweise bei der Probenaufarbeitung auftreten können und gleichermaßen Ziel- und Referenzgen betreffen, werden durch die Normalisierung ausgeglichen und tragen nicht mehr zur Varianz der Ergebnisse bei (Pfaffl, 2004). Zu Beginn dieser Studie wurde gezeigt, dass das β -Aktin-Gen unter den Versuchsbedingungen dieser Studie konstant und hoch exprimiert wird und sich daher zur Normalisierung der untersuchten Gene eignet.

Um verschiedene Versuche vergleichen zu können, wird die Expressionsrate des zu untersuchenden Zielgens bzw. des Referenzgens außerdem in Beziehung zur Expressionsrate einer unstimulierten Kontrolle des Ziel- und Referenzgens gesetzt (Pfaffl, 2004).

2.2.6.5 Berechnung der relativen Genexpression

Um die Änderung der Genexpression einer Zielsequenz relativ zur unstimulierten Kontrolle und normalisiert zum Referenzgen berechnen zu können, wurden zunächst die Effizienzen der Polymerkaskettenreaktionen bestimmt. Werden Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen und Referenzgen nicht berücksichtigt, führt dies zu Unterschieden in den ermittelten Expressionsraten. Unterschiedliche Verdünnungsstufen der jeweiligen cDNA wurden dazu mit den entsprechenden Primern in der PCR untersucht und eine Standardkurve erstellt. Der Logarithmus der Ausgangsmenge an cDNA wurde dabei gegen den C_t -Wert aufgetragen. Es bestand eine lineare Beziehung zwischen den beiden Parametern. Die Steigung wurde nun durch lineare Regression bestimmt und die Effizienz anhand folgender Formel berechnet.

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

In der Regel werden die Effizienzen bei dieser Methode etwas überschätzt, so dass Werte über 2,0 zustande kommen können (Ginzinger, 2002; Pfaffl, 2004). Die berechneten Effizienzen sind in Tabelle 2 auf Seite 40 dargestellt.

Die C_t -Werte wurden durch die Software berechnet. Die Differenz zwischen dem C_t -Wert der unstimulierten Kontrolle und der experimentell behandelten Probe der gleichen Zielsequenz sowie die Differenz zwischen dem C_t -Wert der unstimulierten Kontrolle von β -Aktin und der

experimentell behandelten Probe von β -Aktin wurden bestimmt. Anhand der so ermittelten Werte konnte nun mit folgender Formel die Änderung der relativen Expression des Zielgens bestimmt werden.

$$\text{Ratio} = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta C_t(\text{Zielgen})}}{E(\text{Referenzgen})^{\Delta C_t(\text{Referenzgen})}}$$

mit $\Delta C_t = C_t(\text{Kontrolle}) - C_t(\text{Behandlung})$. Unterliegt das Referenzgen keinen Regulationsmechanismen, dann lässt sich die Formel vereinfacht darstellen, da gilt $\Delta C_t(\text{Referenzgen}) = 0$ und $E(\text{Referenzgen})^{\Delta C_t(\text{Referenzgen})} = 1$ (Pfaffl, 2004).

2.2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software GraphPadPrism version 4.03 für Windows der Fa. GraphPad Software (San Diego, USA) durchgeführt. Jeder Versuch wurde sechsmal durchgeführt ($n = 6$) und im Anschluss die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Unterschiede zwischen verschiedenen Messzeitpunkten wurden mittels t-Tests auf Signifikanz überprüft. Ein Unterschied gilt als signifikant, wenn $p < 0,05$ ist. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Säulendiagramme erstellt.

Gen		Primersequenz	Temperatur
β-Aktin	sense	5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3'	69 °C
	antisense	5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTCG-3'	
hBD-1	sense	5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3'	69 °C
	antisense	5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'	
hBD-2	sense	5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3'	68 °C
	antisense	5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'	
hBD-3	sense	5'-GCTATGAGGATCCATTATCTTCTG-3'	67 °C
	antisense	5'-TTATTTCTTTCTTCGGCAGCATTTTC-3'	
DEFA1	sense	5'-ATGAGGACCCTCGCCATCCTTGCT-3'	69 °C
	antisense	5'-TCAGCAGCAGAATGCCAGCGTCTTCCC-3'	
DEFA4	sense	5'-GTCTGCTCTTGCAGATTAGTATTCTG-3'	69 °C
	antisense	5'-TTAATCGACACGCGTGCAGCAGTAT-3'	
S100A7	sense	5'-ATGAGCAACACTCAAGCTGAGAGG-3'	69 °C
	antisense	5'-TCACTGGCTGCCCCCGGAAC-3'	
S100A4	sense	5'-ATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG-3'	69 °C
	antisense	5'-TCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATC-3'	
Doc-1	sense	5'-ATGTCTTACAAACCGAACTTGGCC-3'	65 °C
	antisense	5'-CTAGGATCTGGCATTCCGTTCC-3'	
Ki67	sense	5'-AAATTCAGACTCCATGTGCCTGAG-3'	66 °C
	antisense	5'-TCAAATACTTCACTGTCCCTATGAC-3'	
EGF	sense	5'-ACAGAATCTCAACACATGCTAGTG-3'	66 °C
	antisense	5'-CAGAACATAGTTTTCCATCCCCAG-3'	
EGFR	sense	5'-CCCAGCAGAGACCCACACTAC-3'	65 °C
	antisense	5'-TCATGCTCCAATAAATTCAGTCTTT-3'	

Tabelle 1: Primersequenzen und deren Temperaturoptima in den RTq-PCR

Gen	Effizienz
β -Aktin	1,84
hBD-1	2,07
hBD-2	2,05
hBD-3	2,06
DEFA1	2,17
DEFA4	1,98
S100A7	1,95
S100A4	2,08
Doc-1	1,90
Ki67	1,91
EGF	1,94
EGFR	1,80

Tabelle 2: Effizienzen der RTq-PCR

3 Ergebnisse

3.1 Relative Genexpression in unstimulierten Zellen

In Tabelle 3 ist die Genexpression in unstimulierten BHY-Plattenepithelkarzinomzellen im Verhältnis zu β -Aktin dargestellt. Die weitaus geringste relative Genexpression zeigen hBD-1 sowie DEFA4. Eine um nahezu 1000-fach höhere Genexpressionsrate weisen hBD-2 und -3, S100A4 sowie DEFA1 auf. Noch höhere Genexpressionsraten zeigen S100A7 sowie Doc-1 und Ki67. Die höchste relative Genexpression aber besitzt EGFR.

Gen	Genexpression
hBD-1	0,00000067
hBD-2	0,00011
hBD-3	0,00012
DEFA1	0,00023
DEFA4	0,00000068
S100A7	0,0052
S100A4	0,0006
Doc-1	0,051
Ki67	0,012
EGF	0,000029
EGFR	0,47

Tabelle 3: Relative Genexpression in unstimulierten BHY-Plattenepithelkarzinomzellen (Kontrolle) im Verhältnis zu β -Aktin

3.2 Relative Genexpression von hBD-1

Nach Stimulation der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF konnte nach 4 h eine signifikante Verminderung der relativen Genexpression von hBD-1 um etwa 85 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen ermittelt werden ($p < 0,01$). Nach 8 h war die relative Genexpression um mehr als 90 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen reduziert ($p < 0,01$). Die relativen Genexpressionen nach 24 h, 48 h und 72 h zeigten im Vergleich zur Genexpression nach 8 h keine wesentlichen Veränderungen mehr (siehe Tabelle 4 auf Seite 45 und Abbildung 1 auf Seite 46).

3.3 Relative Genexpression von hBD-2

Infolge der Inkubation der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF wurde nach 8 h eine Abnahme der Genexpressionsrate von hBD-2 um etwa 70 %, bezogen auf die unstimulierten Zellen, registriert. Auch nach 24 h war die relative Genexpression noch um etwa 20 % vermindert. Die Tendenz einer steigenden Genexpression konnte nach 48 h und 72 h bestätigt werden mit einer 4-fach (nach 48 h) bzw. 3-fach (nach 72 h) höheren Genexpression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die Genexpression von hBD-2 nach 48 h und 72 h war gegenüber der Genexpression im unstimulierten Zustand und gegenüber der Genexpression nach 4 h, 8 h und 24 h signifikant erhöht ($p < 0,01$) (siehe Tabelle 4 auf Seite 45 und Abbildung 1 auf Seite 46).

3.4 Relative Genexpression von hBD-3

Nach einer Stimulationszeit von 4 h und 8 h mit EGF zeigte die relative Genexpression von hBD-3 keine signifikante Änderung im Vergleich zu der in unstimulierten Zellen. Ein signifikanter Anstieg der Genexpressionsrate von hBD-3 auf das mehr als 10-fache der Genexpression im unstimulierten Zustand wurde jedoch nach 24 h verzeichnet ($p < 0,01$). Auch die Genexpression nach 48 h war gegenüber der Genexpression in unstimulierten Zellen sowie gegenüber der Genexpression nach 4 h, 8 h und 24 h signifikant erhöht ($p < 0,01$). Nach 72 h betrug die Genexpression in stimulierten Zellen nahezu das 40-fache im Vergleich zur Genexpression in unstimulierten Zellen (siehe Tabelle 4 auf Seite 45 und Abbildung 2 auf Seite 47).

3.5 Relative Genexpression von DEFA1

Nach Stimulation der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF über einen Zeitraum von 8 h wurde zunächst eine signifikante Abnahme der relativen Genexpression von DEFA1 um 65 % im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ermittelt ($p < 0,01$). Auch nach 24 h Inkubation war die Genexpression noch um etwa 50 % im Vergleich zu den unstimulierten Zellen reduziert. Nach 48 h und 72 h zeigten die Genexpressionsraten von DEFA1 keine wesentlichen Abweichungen von denen der unstimulierten Zellen. Die Änderungen der Genexpression nach 24 h, 48 h und 72 h waren nicht signifikant (siehe Tabelle 4 auf Seite 45 und Abbildung 3 auf Seite 48).

3.6 Relative Genexpression von DEFA4

Die relative Genexpression von DEFA4 war nach vierstündiger Stimulation mit EGF signifikant, um etwa 55 % der Genexpression in unstimulierten Zellen, reduziert ($p < 0,01$). Auch nach 72 h wurde die Genexpression von DEFA4 auf diesem signifikant reduzierten Niveau verzeichnet ($p < 0,01$). Der niedrigste Wert der relativen Genexpression von DEFA4 wurde nach 8 h mit einer signifikanten Abnahme um mehr als 80 % gegenüber den unstimulierten Zellen verzeichnet ($p < 0,01$) (siehe Tabelle 4 auf Seite 45 und Abbildung 3 auf Seite 48).

3.7 Relative Genexpression von S100A7

Nach Zugabe von EGF stieg die relative Genexpression von S100A7 im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach 4 h zunächst um etwa 50 % an. Nach einer vorübergehenden Abnahme nach 8 h auf Werte des unstimulierten Zustandes konnte nach 24 h eine wiederholte Zunahme der relativen Genexpression um etwa 50 % registriert werden. Nach einer Stimulation von 72 h dagegen wurde eine Abnahme der relativen Genexpression um 50 %, bezogen auf den unstimulierten Ausgangszustand, beobachtet. Diese Änderungen der Genexpression waren jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 4 auf Seite 49).

3.8 Relative Genexpression von S100A4

Die relative Genexpression von S100A4 war nach vierstündiger Stimulation mit EGF signifikant, um mehr als die Hälfte im Vergleich zur Genexpression in unstimulierten Zellen, reduziert ($p < 0,01$). Die Stimulationsdauer von 8 h bis zu 72 h führte zu einer weiteren signifikanten Abnahme der Expressionsrate auf etwa 20 % bis 30 % der Genexpression in unstimulierten Zellen ($p < 0,01$) (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 4 auf Seite 49).

3.9 Relative Genexpression von Doc-1

Die Expressionrate von Doc-1 zeigte nach Zugabe von EGF innerhalb von 8 h einen signifikanten Abfall auf 44 % gegenüber der unstimulierten Ausgangssituation ($p < 0,01$). Auch nach 24 h war die Expression von Doc-1 gegenüber der in unstimulierten Zellen signifikant reduziert ($p < 0,01$). Nach 48 h und 72 h erreichte die relative Genexpression Werte, die bis zu 20 % über denen der unstimulierten Zellen lagen. Dieser Anstieg der Expressionsrate war jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 5 auf Seite 50).

3.10 Relative Genexpression von Ki67

Nach vierstündiger Stimulation der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF war die relative Genexpression von Ki67 um mehr als 55 %, bezogen auf die unstimulierten Zellen, vermindert ($p < 0,05$). Nach 8 h konnte wiederum ein Anstieg der Genexpression gegenüber 4 h registriert werden. Nach 24 h bzw. 48 h fand sich die Genexpressionsrate von Ki67 nochmals um etwa 70 % bzw. 60 % und damit signifikant gegenüber den unstimulierten Zellen reduziert ($p < 0,01$), bevor sie nach 72 h auf das Doppelte der Genexpression in unstimulierten Zellen angestiegen war. Der Anstieg der Genexpression nach 72 h war signifikant sowohl gegenüber der Genexpression in unstimulierten Zellen ($p < 0,05$) als auch gegenüber der in den übrigen Stimulationszeiträumen ($p < 0,01$) (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 5 auf Seite 50).

3.11 Relative Genexpression von EGF

Die Genexpression von EGF in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen wurde infolge Inkubation mit EGF signifikant reduziert. Die Genexpressionsrate schwankte im Zeitraum von 4 h bis 72 h zwischen Werten, die um etwa 30 bis 70 % gegenüber unstimulierten Zellen vermindert waren. Die geringste Genexpressionsrate wurde dabei nach 72 h verzeichnet. Diese war sowohl im Vergleich zur Genexpression in unstimulierten Zellen ($p < 0,01$) als auch im Vergleich zu der nach 48 h ($p < 0,001$) signifikant reduziert (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 6 auf Seite 51).

3.12 Relative Genexpression von EGFR

Die Genexpressionsrate von EGFR änderte sich nach Stimulation der BHY-Plattenepithelkarzinomzellen mit EGF nicht wesentlich gegenüber der Genexpression in unstimulierten Zellen. Allein eine tendenzielle Abnahme der Genexpression um etwa 35 % und 25 % konnte nach 24 h und 48 h registriert werden (siehe Tabelle 5 auf Seite 45 und Abbildung 6 auf Seite 51).

Zeit	hBD-1	hBD-2	hBD-3	DEFA1	DEFA4
4 h	0,154	0,81	1,32	0,66	0,44
8 h	0,077	0,29	0,81	0,35	0,17
24 h	0,083	0,81	10,6	0,47	0,29
48 h	0,077	4,0	29,9	1,1	0,29
72 h	0,095	3,0	39,4	1,2	0,47

Tabelle 4: Relative Genexpressionsänderung von hBD-1, hBD-2, hBD-3, DEFA1 und DEFA4 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt.

Zeit	S100A7	S100A4	Doc-1	Ki67	EGF	EGFR
4 h	1,52	0,38	0,71	0,44	0,54	0,93
8 h	0,9	0,2	0,44	0,87	0,66	0,87
24 h	1,4	0,18	0,44	0,33	0,41	0,66
48 h	0,76	0,29	1,2	0,41	0,73	0,76
72 h	0,5	0,25	1,1	2,0	0,31	0,93

Tabelle 5: Relative Genexpressionsänderung von S100A7, S100A4, Doc-1, Ki67, EGF und EGFR in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt.

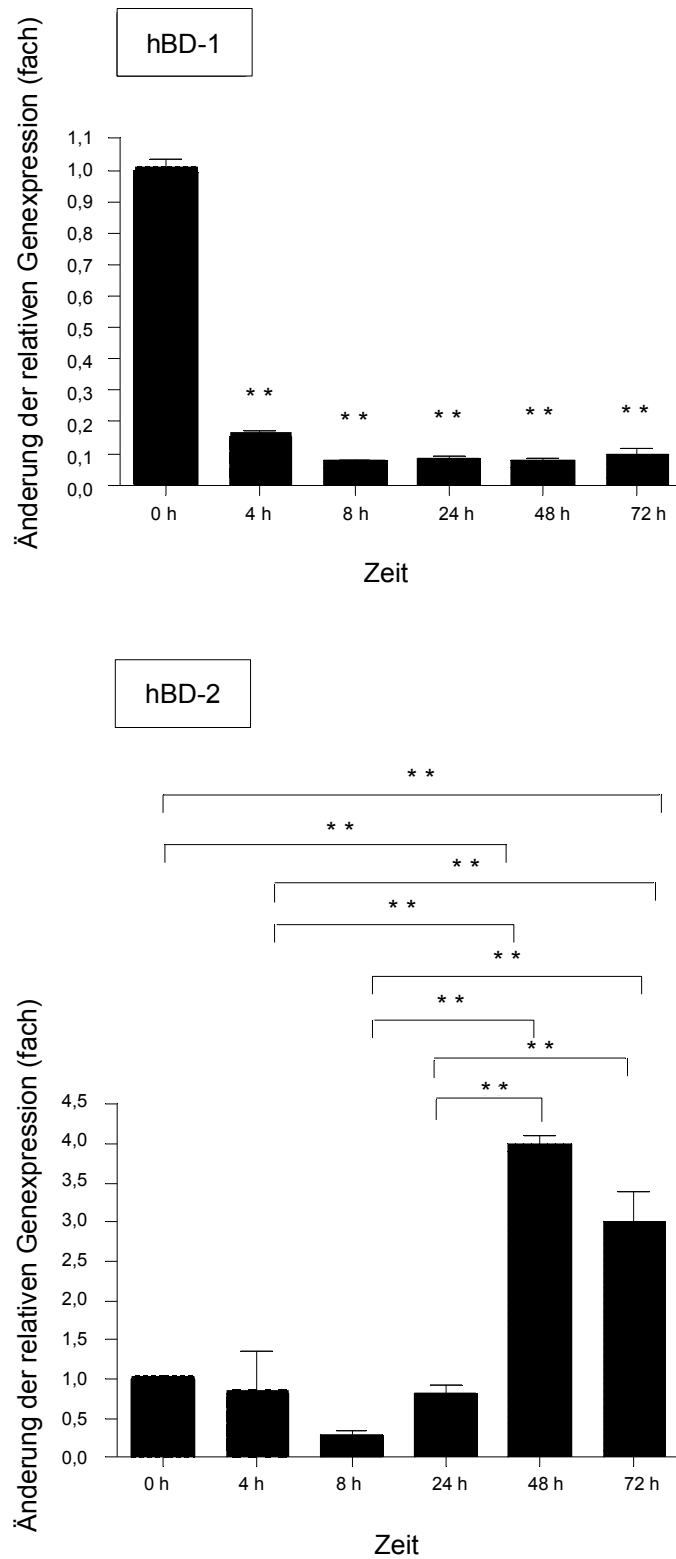


Abbildung 1: Relative Genexpressionsänderung von hBD-1 und hBD-2 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt.

** bedeutet für hBD-1 ein signifikanter Unterschied zu $t = 0$ ($p < 0,01$) und für hBD-2 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

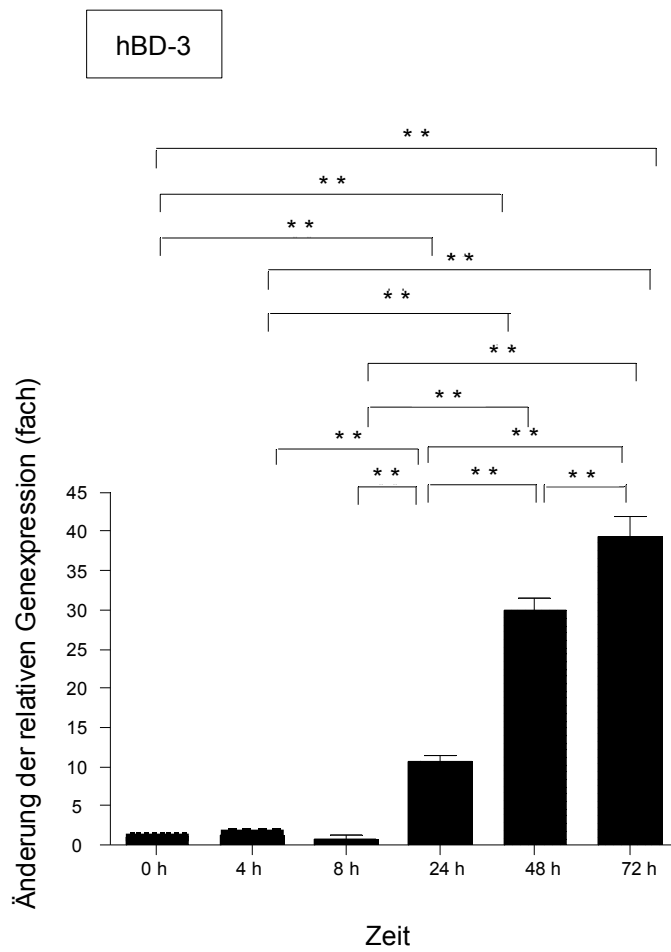


Abbildung 2: Relative Genexpressionsänderung von hBD-3 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1 ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. ** bedeutet ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

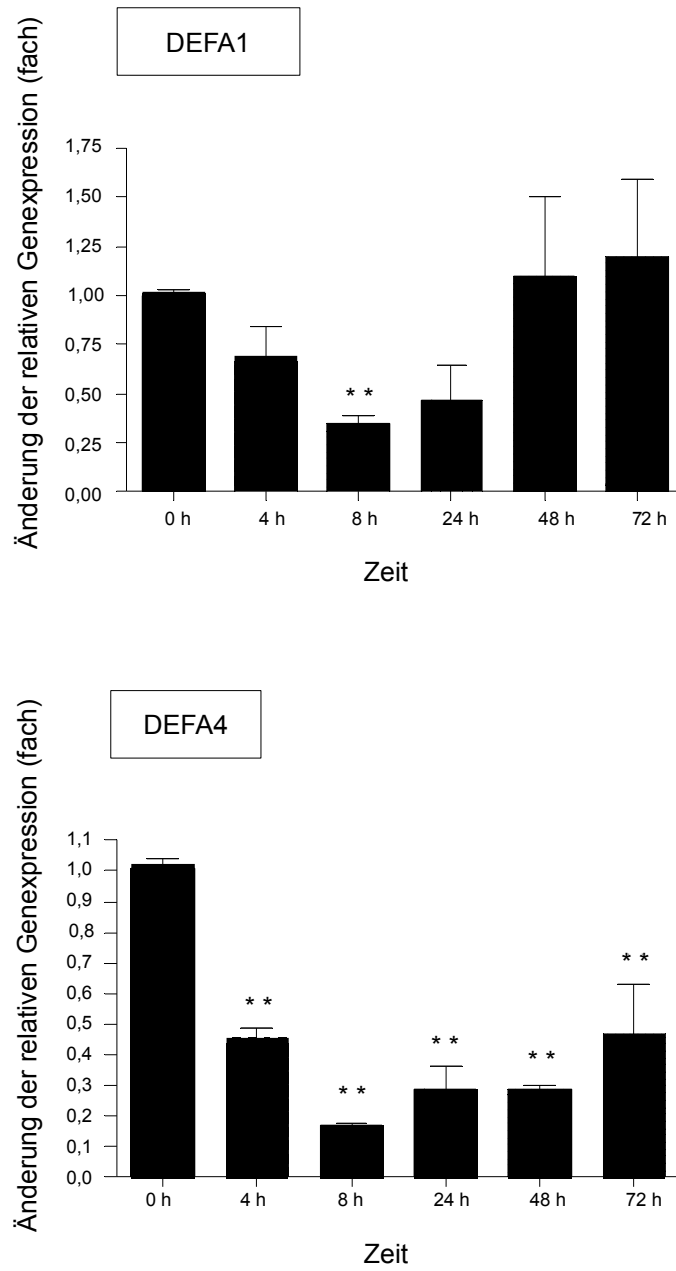


Abbildung 3: Relative Genexpressionsänderung von DEFA1 und DEFA4 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. ** bedeutet ein signifikanter Unterschied zu $t = 0$ ($p < 0,01$).

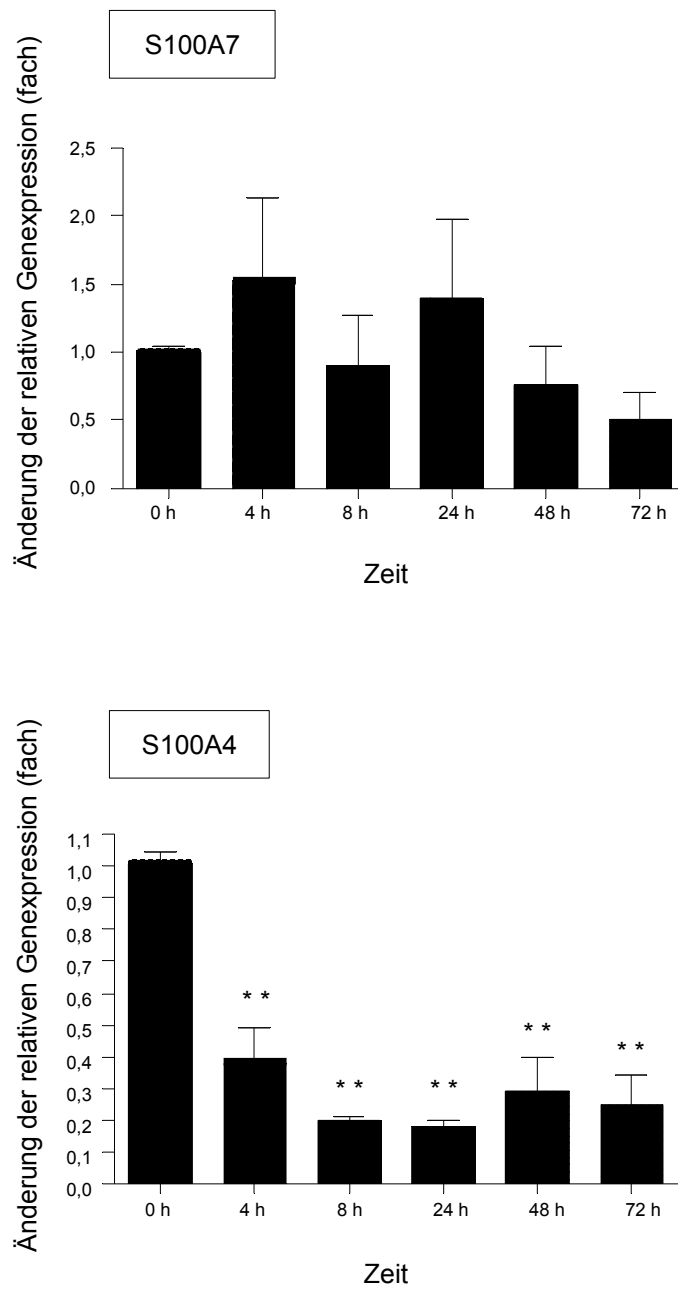


Abbildung 4: Relative Genexpressionsänderung von S100A7 und S100A4 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. ** bedeutet ein signifikanter Unterschied zu $t = 0$ ($p < 0,01$).

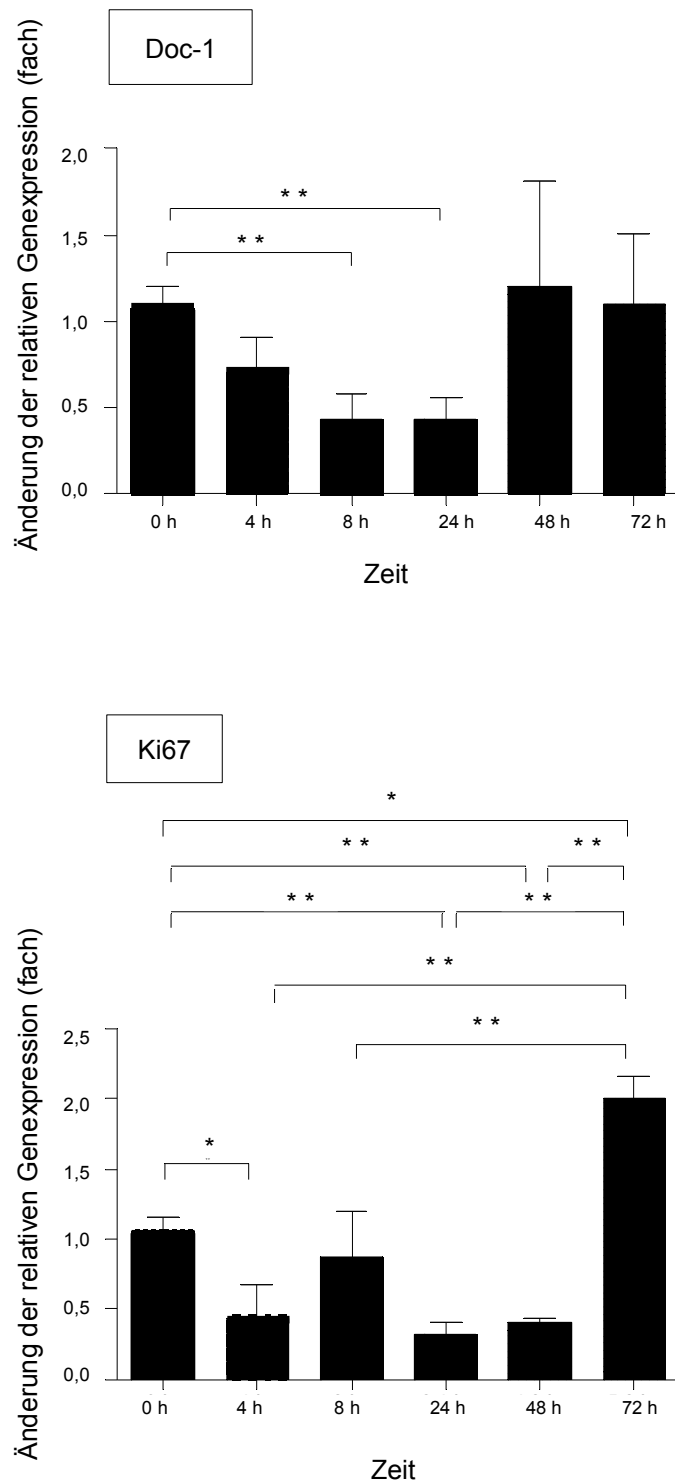


Abbildung 5: Relative Genexpressionsänderung von Doc-1 und Ki67 in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. ** bedeutet ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$), * bedeutet ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

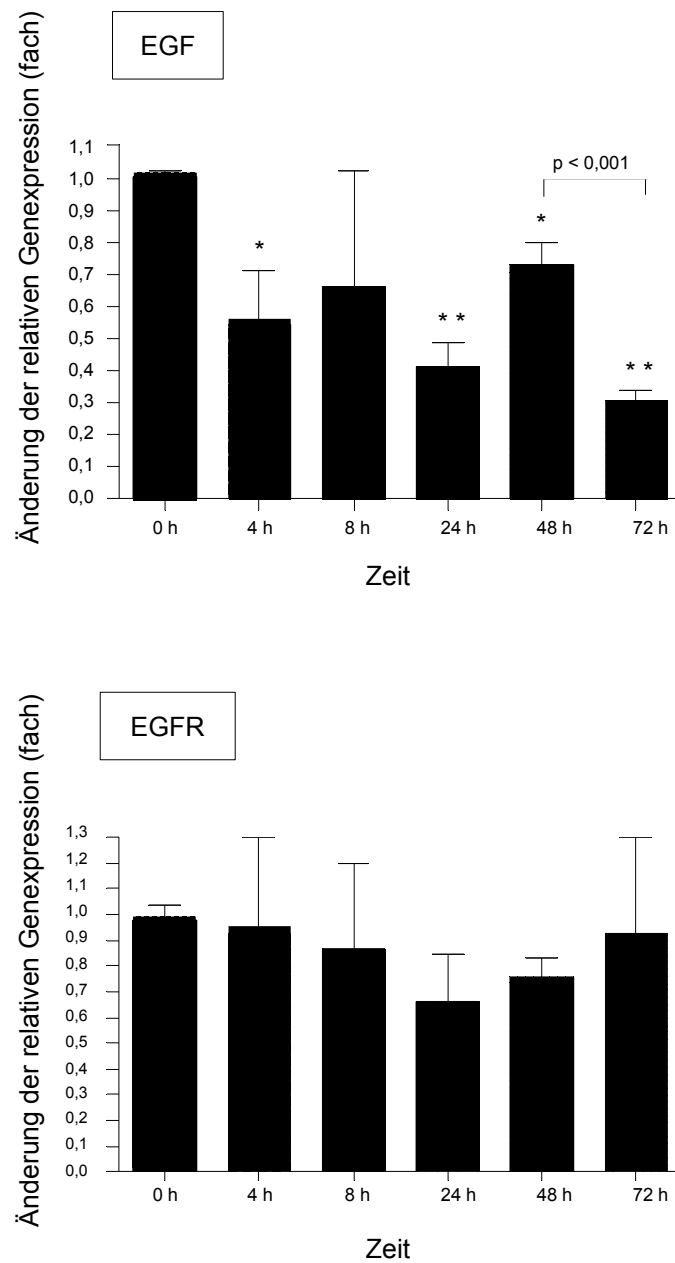


Abbildung 6: Relative Genexpressionsänderung von EGF und EGFR in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF (1ng/ml) über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die Werte sind als Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. ** bedeutet ein signifikanter Unterschied zu $t = 0$ ($p < 0,01$), * bedeutet ein signifikanter Unterschied zu $t = 0$ ($p < 0,05$).

4 Diskussion

Die Ansammlung multipler Mutationen im Genom einer epithelialen Zelle, insbesondere die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, erlaubt die maligne Transformation einer Zelle. Autonomes Zellwachstum resultiert aus einem gestörten Gleichgewicht zwischen Proliferation einerseits und Apoptose und Differenzierung andererseits (Wong et al., 1996). Die aktivierten Protoonkogene stellen vor allem Komponenten der zellulären Signaltransduktion und der intrazellulären Signalkaskaden dar. Auch das Gen des EGFR zählt zu den Protoonkogenen. Eine erhöhte Aktivität des EGFR wurde in vielen oralen Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen (Grandis und Tweardy, 1993). Sie resultiert aus einer erhöhten Genexpression des Rezeptors, aus Mutationen mit dauerhafter Aktivierung des Rezeptors oder aus autokrinen Stimulationsmechanismen bei Coexpression von Wachstumsfaktorgenen (Prenzel et al., 2001). Die Genexpressionsrate des EGFR sowie seiner Liganden gilt in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches als wichtiger prognostischer Faktor, um den klinischen Verlauf sowie die allgemeine und rezidivfreie Überlebensrate des Patienten abzuschätzen. Erhöhte Genexpression ist verbunden mit einem fortgeschrittenen Stadium und damit einer schlechteren Prognose, ferner mit erhöhter Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie und Metastasierung (Merlano und Occelli, 2007). Nicholson et al. wiesen darauf hin, dass sich die prognostische Aussagekraft weiter verbessern ließe, wenn weitere Faktoren wie der Aktivierungsstatus der Rezeptoren oder die Komponenten der Signalkaskaden des EGFR in der Analyse berücksichtigt würden (Nicholson et al., 2001). Neben der aberranten Aktivierung des EGFR wurde die Beteiligung vieler anderer Onkogene und Tumorsuppressorgene an der Entstehung und dem Fortschreiten des oralen Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen oder diskutiert. Auch Veränderungen der Genexpression von humanen Defensinen, S100 Proteinen und der Expression von Doc-1 wurde in oralen Plattenepithelkarzinomen gegenüber normalem Gewebe demonstriert (Kesting et al., 2009; Shintani et al., 2001; Wenghoefer et al., 2008a). Über die molekularen Mechanismen, die diesen veränderten Genexpressionen in oralen Plattenepithelkarzinomen zugrunde liegen, ist bisher wenig bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von EGF auf die Expression der in Kopf-Hals-Tumoren onkologisch relevanten Gene von hBD-1, -2 und -3, DEFA1 und DEFA4, S100A7 und S100A4, Doc-1 sowie von Ki67 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen zu untersuchen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden in vitro anhand der Zelllinie BHY, welche

aus dem hochdifferenzierten oralen Plattenepithelkarzinom eines Patienten kultiviert wurde, durchgeführt.

Unter den untersuchten Genen zeigte hBD-1 in unstimulierten BHY-Plattenepithelkarzinomzellen die weitaus geringste relative Genexpression. Nach Zugabe von EGF zu den Zellen nahm die Genexpression von hBD-1 bereits nach 4 h Inkubationszeit signifikant, um mehr als 85 %, ab. Nach 8 h war die Genexpression um mehr als 90 % vermindert und zeigte bei längerer Stimulationsdauer gegenüber der Genexpression nach 8 h keine signifikanten Veränderungen mehr.

Eine reduzierte Genexpression von hBD-1 in oralen Plattenepithelkarzinomen konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden (Abiko et al., 1999; Wenghoefer et al., 2008b). Ein tumorspezifischer Verlust der Genexpressionsrate konnte ferner in Nieren- und Prostatakarzinomen festgestellt werden. Dem Gen von hBD-1 wird in letzteren die Funktion eines Tumorsuppressorgens zugeschrieben. Reexpression führte hier zu verminderter Tumorzellproliferation (Donald et al., 2003; Sun et al., 2006). Auch in oralen Plattenepithelkarzinomen wird die Funktion eines Tumorsuppressorgens diskutiert. Mutationen, insbesondere aber Verluste des kurzen Arms von Chromosom 8, auf dem auch die humanen Defensine kodiert sind, sind ein sehr häufiges Ereignis im Rahmen der Tumorgenese. Diese genetischen Veränderungen unterstützen die Vermutung, hBD-1 sei ein Tumorsuppressor (Meyer und Harder, 2007). Die genauen Mechanismen, nach denen eine Inaktivierung des potentiellen Tumorsuppressors in oralen Plattenepithelkarzinomen erfolgt, sind letztlich jedoch nicht bekannt. Neben Polymorphismen des Promoters ist auch eine Autoregulation des Promoters denkbar, die zu verminderter Genexpression führt. Diese Regulation könnte durch Translokation und Akkumulation von hBD-1 im Zellkern der Tumorzellen erfolgen, die sowohl in malignen Speicheldrüsentumoren als auch in pleomorphen Adenomen nachgewiesen sind (Pantelis et al., 2009; Wenghoefer et al., 2008a). Die in dieser Studie erhaltenen Daten geben neue Hinweise darauf, dass EGF in einer noch unbekannten Form an der Regulation, womöglich auch an einer Translokation von hBD-1 in den Zellkern, beteiligt sein könnte.

Die Beteiligung von c-myc an der Genexpressionsregulation von hBD-1 wird außerdem diskutiert. Die Promoterregion besitzt einige potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor c-myc. Über welchen Signalweg jedoch eine Akkumulation von c-myc und eine damit einhergehende Genexpressionssteigerung von hBD-1 ausgelöst wird, ist nicht bekannt (Sherman und Froy, 2008).

Eine reduzierte Genexpression von hBD-1 kann schon in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden, so dass der Verlust von hBD-1 möglicherweise schon früh in der Tumorgenese statt-

findet und zu der malignen Progression beitragen könnte (Wenghoefer et al., 2008b). Dies ist eine Parallele zu der frühen Aktivierung des Protoonkogens EGFR in der Tumorgenese von oralen Plattenepithelkarzinomen. Die in dieser Studie gewonnenen Daten unterstützen die Hypothese, dass der frühe Verlust an hBD-1 möglicherweise mit der frühen Aktivierung des Protoonkogens EGFR assoziiert sein könnte. Möglicherweise spielt hBD-1 eine Rolle in der Transkriptionskontrolle und der Induktion der Apoptose (Wenghoefer et al., 2008a). Die geringen Konzentrationen an hBD-1 wurden aber auch in Beziehung zu einer hohen Anfälligkeit des Tumors gegenüber bakteriellen Infektionen gesetzt (Abiko et al., 1999). Ein Verlust der hBD-1-Genexpression könnte dazu führen, dass weniger T-Lymphozyten und dendritische Zellen rekrutiert werden, um Tumorzellen als fremd zu erkennen und zu zerstören. Durch den fehlenden zytotoxischen Effekt von hBD-1 auf die Tumorzellen könnte so zusätzlich die Tumorprogression gefördert werden (Donald et al., 2003).

Die relative Genexpression von hBD-2 zeigte nach Stimulation mit EGF nach 8 h eine Abnahme auf etwa 30 % der Genexpression der unstimulierten Zellen. Dagegen konnte nach 48 h eine 4-fach höhere und nach 72 h eine 3-fach höhere Genexpression bezogen auf die unstimulierten Zellen verzeichnet werden. Diese Veränderungen sind Hinweis darauf, dass EGF zeitabhängig die Genexpression von hBD-2 beeinflussen kann. Während EGF initial einen negativen Einfluss auf die Genexpression zu haben scheint, kehrt sich dieser regulative Effekt nach 48 h um.

Die Promoterregion des Gens von hBD-2 besitzt mehrere mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Liu et al., 1998). In mehreren Zellarten konnte gezeigt werden, dass über Zytokin- und Toll-like-Rezeptoren und unter Mitbeteiligung von NF- κ B die Genexpression von hBD-2 gesteigert werden kann (Froy, 2005). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist auch als Komponente der Signalkaskade von EGFR bekannt und verursacht so zu der Hypothese, dass auch EGF über NF- κ B Einfluss auf hBD-2 nehmen könnte. Erhöhte Genexpression von hBD-2 kann aber auch über den Transkriptionsfaktor AP-1 sowie durch Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK vermittelt werden. MAP-Kinasen sind auch Bestandteil verschiedener Signalkaskaden des EGFR und könnten an der in dieser Studie beobachteten Wirkung von EGF beteiligt sein.

Die zeitabhängige Änderung der Genexpression mit initialer Abnahme und sekundärem Anstieg deutet auf einen komplexen Regulationsmechanismus hin. Genexpressionssteigerung in oralen Keratinozyten durch entzündliche und bakterielle Stimuli war schon nach 2 h sowie nach 10 bis 12 h zu beobachten (Krisanaprakornkit et al., 2000). Die Signalkaskade, die durch entzündliche Stimuli aktiviert wird, scheint unter diesem Aspekt von dem durch EGF ver-

mittelten Signalweg verschieden zu sein.

Mizukawa et al. konnten zeigen, dass die Bildung von hBD-2 in oralen Plattenepithelkarzinomen in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung und Keratinisierung erfolgt (Mizukawa et al., 2000). Dass die Genexpression von hBD-2 in einer Art und Weise an die Differenzierung der Zellen gebunden ist, konnte auch von Kawsar et al. ermittelt werden, die hBD-2 im Stratum granulosum und spinosum in normalem oralen Epithel und differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen lokalisierten (Kawsar et al., 2009). Auch Abiko et al. fanden in hoch differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen hohe mRNA- und Proteinkonzentrationen von hBD-2, während in gering differenzierten Plattenepithelkarzinomen weder hBD-2-mRNA noch hBD-2-Proteine nachweisbar waren (Abiko et al., 2001). Weiterhin konnte eine Beziehung hergestellt werden zwischen hohen Konzentrationen an hBD-2 und einer besseren Prognose gegenüber Patienten mit geringeren Mengen an hBD-2 (Sawaki et al., 2002). Ob EGF über einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung auf die Genexpressionsrate von hBD-2 wirken könnte, ist unklar. Insgesamt sind die Studien, die den Zusammenhang zwischen der Differenzierung eines Plattenepithelkarzinoms und der Aktivität des EGFR untersucht haben, kontrovers. Die überwiegende Zahl bringt eine erhöhte Aktivität des Rezeptors in Zusammenhang mit einer schlechten Differenzierung und einer ungünstigen Prognose. Nur wenige kommen zu dem Schluss, dass EGFR in oralen Plattenepithelkarzinomen mit Differenzierung und einer guten Prognose positiv korreliert (Yamada et al., 1992). Andere wiederum erkennen keinen Zusammenhang zwischen EGFR und der Differenzierung (Hiraishi et al., 2006).

Nach einer Stimulationsdauer von 24 h wurde ein signifikanter Anstieg der Genexpression von hBD-3 auf das mehr als 10-fache gegenüber den unstimulierten Zellen beobachtet. Die Genexpression stieg weiter an und war nach 72 h um nahezu 40-fach höher als in den nicht-stimulierten Zellen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass EGF einen positiven Einfluss auf die Genexpressionsrate von hBD-3 ausübt. Dieser Effekt kommt erst nach 24 h zum Ausdruck und ähnelt damit in seiner Zeitabhängigkeit dem Einfluss auf hBD-2.

Bereits Kawsar et al. beobachteten, dass EGF die Genexpression von hBD-3 in dysplastischen oralen Epithelzellen sowie in oralen Plattenepithelkarzinomzellen induzieren kann. Sie zeigten ferner, dass daran die MEK1 und 2, p38, Proteinkinase C und Phosphatidylinositol-3-Kinase beteiligt sind (Kawsar et al., 2009). Sørensen et al. konnten zeigen, dass die Expression von hBD-3 in epidermalen Keratinozyten über die Transaktivierung von EGFR sowie durch Bindung von EGF an diesen induziert werden kann (Sørensen et al., 2005, 2006). Eine Beziehung zwischen der Genexpression von hBD-3 und der Wirkung von EGF konnte nun in der vorliegenden Arbeit für orale Plattenepithelkarzinomzellen bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser

Studie deuten darauf hin, dass die Genexpression von hBD-3 auch direkt über EGFR und nicht nur über Mechanismen der Transaktivierung gesteigert werden kann. Es wurde mehrfach angedeutet, dass die Genexpression von hBD-2 und hBD-3 auf unterschiedliche Weise reguliert wird (Kawsar et al., 2009; Steubesand et al., 2009; Boughan et al., 2006). Auch hier weisen die unterschiedlich starken Anstiege der Genexpression auf differente Mechanismen hin.

Eine erhöhte Genexpression von hBD-3 findet bereits in prämaligen Zellen statt (Kawsar et al., 2009; Wenghoefer et al., 2008b). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der frühen Aktivierung des EGFR und der frühen Überexpression von hBD-3 in der Tumorgenese. HBD-3 wird primär in den basalen Plattenepithelzellen gebildet (Kawsar et al., 2009). Seine Lokalisation entspricht damit der bevorzugten Lokalisation des EGFR in normalen epithelialen Zellen. Dies unterstützt die Vorstellung, dass die Aktivierung des EGFR einer Zelle die Genexpression von hBD-3 in dieser Zelle induzieren könnte.

Es stellt sich die Frage, welche tumorspezifischen Auswirkungen die erhöhte Genexpression von hBD-3 auf die Tumorzellen hat. Dabei muss stets bedacht werden, dass die Genexpression allein noch keine Aussage über die tatsächlichen Proteinkonzentrationen und -aktivitäten zulässt. Neben der bei hBD-1 vermuteten Funktion als Tumorsuppressor könnten humane Defensine in Tumoren womöglich auch eine immunmodulierende Funktion übernehmen. So konnte eine Korrelation zwischen der Expression von hBD-3 in oralen Plattenepithelkarzinomen und der Infiltration mit Makrophagen gefunden werden. Eine Rekrutierung von T-Lymphozyten wurde hingegen nicht beobachtet. Dies ließ vermuten, dass hBD-3 über die Rekrutierung von Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen, die Tumorentwicklung unterstützt (Kawsar et al., 2009; Marcus et al., 2004). Sica et al. zeigten, dass das Vorherrschen von Makrophagen im peritumoralen Infiltrat verbunden ist mit einer verminderten rezidivfreien Überlebensrate und damit einer schlechteren Prognose und führten dies zurück auf die Beeinflussung von Angiogenese, Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung sowie Unterdrückung der adaptiven Immunantwort durch die Makrophagen (Sica et al., 2006). Makrophagen stimulieren die endotheliale Proliferation und Migration und schütten proangiogenetische Faktoren wie Matrixmetalloproteinasen aus. In oralen Plattenepithelkarzinomen konnten sie mit Metastasierung und Invasion korreliert werden (Liu et al., 2008). Ob hBD-3 und auch hBD-2 über den Chemokinrezeptor CCR6 eine Rekrutierung der angeborenen Immunzellen erreichen, wird kontrovers diskutiert (Soruri et al., 2007; Yang et al., 1999). Niyonsaba et al. zeigten, dass hBD-2 und hBD-3 in Keratinozyten die Genexpression verschiedener Zytokine wie IL-10 sowie von MCP-1 und MIP-3 α steigern (Niyonsaba et al., 2007). Möglicherweise können hBD-2 und hBD-3 auch in oralen Plattenepithelkarzinomzellen deren Genexpression

fördern und auf diesem Weg chemotaktisch wirken. Interessant ist ferner die Beobachtung, dass hBD-2 und hBD-3 selbst die Proliferation und Migration von Keratinozyten stimulieren können. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt vermutlich über Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR sowie von STAT1 und STAT3 vermittelt wird (Niyonsaba et al., 2007). Diese Beobachtung impliziert, dass hBD-2 und -3 auch orale Plattenepithelkarzinomzellen zu Proliferation und Migration anregen könnten. Wenn EGF nun die Genexpression dieser beiden Defensine fördert und diese wiederum über einen autokrinen Mechanismus auf den EGFR derselben Zelle wirken würden, dann könnte man letztendlich eine Selbstverstärkung der ursprünglichen proliferativen Wirkung des EGF mutmaßen. Eine Stimulation von Proliferation und Migration von Keratinozyten durch hBD-2 und hBD-3 wurde bislang in Tumorzellen noch nicht beschrieben.

Nach Stimulation mit dem EGF wurde innerhalb von 8 h eine signifikante Abnahme der relativen Genexpression von DEFA1 um mehr als 60 % gegenüber den unstimulierten Zellen beobachtet. Die Werte deuten an, dass EGF die Genexpression von DEFA1 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen in diesem initialen Zeitraum herunterregulieren kann.

Die Wirkungen humaner α -Defensine auf das Tumorstadium scheinen konzentrationsabhängig zu sein. In hohen Konzentrationen besitzen humane α -Defensine einen zytotoxischen Effekt auf kernhaltige eukaryotische Zellen. Sie greifen vermutlich bevorzugt Tumorzellen an, da diese eine negativere Ladung der Zellmembran sowie eine höhere Anzahl an Mikrovilli als normale Zellen besitzen (Meyer und Harder, 2007). Außerdem wurde beobachtet, dass humane α -Defensine die Angiogenese inhibieren, indem sie die endotheliale Proliferation, Adhäsion an extrazelluläre Matrix und Migration negativ beeinflussen (Chavakis et al., 2004).

In geringeren Konzentrationen können α -Defensine die systemische Immunantwort regulieren. Sie rekrutieren unreife dendritische Zellen, CD8⁺ und naive CD4⁺ T-Lymphozyten sowie Monozyten und fördern darüber vermutlich die Tumorzellproliferation sowie proangiogenetische und prometastatische Effekte (Albrethsen et al., 2005). In Nierenkarzinomzellen stimulieren humane α -Defensine in geringen Konzentrationen die Proliferation (Müller et al., 2002). Auch in Epithelzellen der Lunge konnten humane α -Defensine in niedrigen Konzentrationen eine Proliferation hervorrufen (Aarbiou et al., 2002).

Folglich konnten kontroverse Wirkungen der humanen α -Defensine in Bezug auf Tumoren beobachtet werden. Die Wirkungen wurden bisher nur sehr tumorspezifisch nachgewiesen und variieren in Abhängigkeit von der Konzentration der α -Defensine. Über die Genexpressionsraten und die spezifischen Wirkungen der humanen α -Defensine in oralen Plattenepithelkarzinomzellen, auch und vor allem in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, ist bisher wenig

bekannt. Möglicherweise übt EGF über initiale Verminderung der Genexpression und über eine daraus resultierende geringe Konzentration des DEFA1-Proteins einen tumorfördernden Effekt aus. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die vorliegende Studie eine Aussage über die tatsächlich vorliegenden Proteinkonzentrationen der α -Defensine nicht zulässt.

Die relative Genexpression von DEFA4 in unstimulierten Plattenepithelkarzinomzellen war, ähnlich der Genexpression von hBD-1, auffallend gering. Zusätzlich wurde die Genexpression DEFA4 durch Stimulation mit dem EGF bereits nach 4 h signifikant reduziert. Auch nach einer Stimulationsdauer von 72 h blieb die Genexpressionsrate gegenüber der in unstimulierten Zellen signifikant vermindert. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass EGF die Genexpression von DEFA4 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen negativ beeinflusst.

In der Literatur wurde bislang lediglich die Genexpression von DEFA1 bis DEFA3 in Tumorgewebe untersucht. Die Genexpressionsrate von DEFA4 in oralen Plattenepithelkarzinomen oder anderen Tumoren wurde bislang nicht untersucht.

Nach Stimulation mit EGF zeigte sich innerhalb von 4 h zunächst eine Zunahme der relativen Genexpression von S100A7 um etwa 50 %. Auch nach einem Zeitraum von 24 h war die Genexpression gegenüber dem unstimulierten Zustand tendenziell erhöht. Nach 72 h dagegen lag eine um 50 % reduzierte Expressionsrate vor. Die Veränderungen im Genexpressionsmuster von S100A7 deuten auf eine Beeinflussbarkeit durch EGF hin. Es handelt sich um das einzige der hier untersuchten Gene, dass initial eine Zunahme seiner Expression zeigt. Mit zunehmender Zeit (72 h) scheint die Stimulation mit EGF jedoch eine verminderte Expression von S100A7 zu verursachen.

In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass die Expression von S100A7 in normalen Keratinozyten mit deren Differenzierungsgrad korreliert. Während die undifferenzierten, aber proliferierenden epidermalen Basalzellen kein S100A7 exprimierten, war die Genexpression in differenzierten Epithelzellen nachweisbar (Martinsson et al., 2005). In präkanzerösen oralen Läsionen ist S100A7 eines der am meisten hochregulierten Gene. Kesting et al. demonstrieren, dass die Genexpression von S100A7 in hoch differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen signifikant höher war als in moderat oder schlecht differenzierten (Kesting et al., 2009). Auch Zhou et al. fanden hohe Expressionsraten von S100A7 in differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen, die noch kein invasives Wachstum zeigten und sich in einem frühen Stadium befanden. Sie konnten zeigen, dass S100A7 die Proliferation von oralen Plattenepithelkarzinomzellen in vitro sowie Tumorwachstum und Invasion in vivo verhindern kann. Dem Protein wurde deshalb die Funktion eines Tumorsuppressors zugeschrieben, dessen Genex-

pression im Laufe der Tumorgenese verlorengeht. Verminderte Genexpression korrelierte mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Invasion (Zhou et al., 2008).

Bei der Frage nach den Regulationsmechanismen der Genexpression von S100A7 liegt die Vermutung nahe, dass Faktoren beteiligt sind, die mit dem Prozess der Differenzierung und Invasion assoziiert sind. Tatsächlich kann die Genexpression stimuliert werden durch Retinolsäure, Calcium, UV-Licht, durch Verlust der Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix sowie durch Wachstumsfaktorentzug (Martinsson et al., 2005). Die Genexpression von S100A7 in Tumoren impliziert, dass auch EGF über die Aktivierung seines Rezeptors etwas mit der Regulation zu tun haben könnte. Miyazaki et al. fanden tatsächlich eine verminderte Genexpression von S100A7, nachdem Zellen eines oralen Plattenepithelkarzinoms mit EGF inkubiert worden waren. Dabei fand eine Inkubation mit EGF in der Konzentration 2 ng/ml und über den Zeitraum von 24 h statt (Miyazaki et al., 2006). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sind konsistent mit der aktuellen Literatur und zeigen, dass EGF die Expression von S100A7 beeinflussen kann. Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen von Miyazaki et al. könnten zeit- und konzentrationsbedingt sein sowie mit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der jeweils verwendeten Zelllinien zusammenhängen.

Die Promotorregion von S100A7 gibt Hinweis darauf, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 eine Rolle bei der Regulation der Expression spielt (Alowami et al., 2003). Außerdem wird die Expressionsrate von S100A7 über die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade vermindert. Das onkogene Protein c-myc ist ein Zielprotein dieser Signalkaskade und korreliert mit uneingeschränkter Proliferation, verhindert Differenzierung und Adhäsion und stimuliert Wachstum, Angiogenese und Metastasierung. Auch c-myc selbst scheint die Expression von S100A7 unterdrücken zu können (Zhou et al., 2008). Es existieren Effektor- und Zielproteine, die sowohl an der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade als auch am Signaltransduktionsweg von EGF beteiligt sind, beispielsweise die Proteinkinase Akt und c-myc. Miyazaki et al. fanden, dass EGF eine erhöhte Genexpression von Dickkopf-3 bewirkt. Dickkopf-3 ist ein Antagonist des Wnt-Signalweges (Miyazaki et al., 2006). Somit wäre ein indirekter Einfluss von EGF auf den Wnt-Signalweg und damit auf S100A7 denkbar.

Infolge der Zugabe von EGF zu den humanen Plattenepithelkarzinomzellen konnte eine signifikante Reduktion der relativen Genexpression von S100A4 beobachtet werden. Die Expression betrug bereits nach 4 h nur noch 38 % der ursprünglichen Genexpression. Die Stimulation über 8 h bis hin zu 72 h ergab eine weitere Abnahme der relativen Genexpression. Diese Ergebnisse deuten eine potentielle Regulation der Expression von S100A4 durch EGF an.

In der Literatur finden sich jedoch kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Expression und

der funktionellen Bedeutung von S100A4 in humanen Tumoren, insbesondere auch in oralen Plattenepithelkarzinomen. Überexpression von S100A4-Gen wurde in vielen oralen Tumoren nachgewiesen und in Beziehung zu erhöhter Metastasierung und schlechter Prognose gesetzt. Die genauen Mechanismen sind unklar. Es wurde vermutet, dass S100A4 insbesondere über die Aktivierung des NF- κ B an tumorspezifischen Prozessen der Metastasierung, Invasion und Angiogenese beteiligt ist (Boye et al., 2008).

Sapkota et al. fanden dagegen eine verminderte Genexpression von S100A4 in oralen Plattenepithelkarzinomen gegenüber normalem Gewebe (Sapkota et al., 2008). Auch in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Ji et al., 2004) wurden verminderte mRNA-Konzentrationen von S100A4 vorgefunden. Hypermethylierung der DNA scheint zu einer Abnahme der S100A4-Genexpression zu führen (Sapkota et al., 2008). Ji et al. vermuteten, dass die Translation der mRNA von S100A4 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen könnte (Ji et al., 2004). Die in dieser Studie erhobenen Daten sind erste Hinweise darauf, dass auch EGF an der Regulation der S100A4-Genexpression beteiligt sein könnte. Auf welche Weise der negative Effekt auf die Genexpressionsrate hervorgerufen wird, ist jedoch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha 6 \beta 4$ die Genexpression von S100A4 in humanen Tumorzellen steigern kann (Chen et al., 2009; Kim et al., 2009). EGF verursacht eine Phosphorylierung der $\beta 4$ -Untereinheit des Integrins und verhindert dadurch die Kopplung des Integrins an das Adapterprotein Shc und damit weitere Signalkaskaden (Mainiero et al., 1996). Dies gibt Anlass zu der Hypothese, dass EGF über Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Einfluss auf die Genexpression von S100A4 nimmt. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang zum Differenzierungsgrad der verwendeten Zelllinie: Die Zelllinie BHY stammt von einem hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinom des Unterkiefers, das zwar eine lokale Invasion in die Mandibula und die Mundbodenmuskulatur aufwies, jedoch noch keine Metastasierung zeigte (Kawamata et al., 1997). Die Genexpression von S100A4 ist jedoch gerade mit Lymphknotenmetastasierung und schlechter Prognose korreliert.

Die relative Expression von Doc-1 war im Vergleich zu den übrigen untersuchten Genen in unstimulierten Plattenepithelkarzinomzellen sehr hoch. Die Expressionsrate von Doc-1 zeigte dann nach Zugabe von EGF innerhalb von 8 h eine signifikante Abnahme gegenüber den unstimulierten Zellen. Die Werte nach 48 h und 72 h zeigten eine sehr hohe Standardabweichung und sind nur eingeschränkt zu beurteilen. Die Werte deuten darauf hin, dass EGF die Expression von Doc-1 direkt oder indirekt herunterregulieren kann.

Doc-1 kann den Zellzyklus in der G1-Phase stoppen und so die Replikation der DNA in der S-Phase verhindern. Um autonomes Tumorwachstum zu ermöglichen, muss diese Funktion

vermindert oder ausgeschaltet werden. Reduzierte oder sogar fehlende Expression von Doc-1 ist ein bekanntes Phänomen in oralen Tumoren. Doch wie die Inaktivierung von Doc-1 erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Die Daten dieser Arbeit deuten nun darauf hin, dass EGF dazu beitragen könnte. Schon Shintani et al. vermuteten, dass regulatorische Signale des G1/S Übergangs oder der Replikationsphase an der Regulation von Doc-1 beteiligt sein könnten (Shintani et al., 2000). Diese Vermutung ist konsistent mit Ergebnissen der vorliegenden Studie. Darüber hinaus werden posttranslationale Regulationsmechanismen diskutiert (Shintani et al., 2001). Wie die erhöhte Aktivierung von EGFR korreliert auch die verminderte Expression von Doc-1 in oralen Tumoren mit erhöhter Invasion, fortgeschrittenem Tumorstadium und Metastasierung. Dies befürwortet die Vermutung, dass EGF und Doc-1 in Verbindung stehen könnten.

Nach Stimulation der humanen Plattenepithelkarzinomzellen mit dem EGF wurde zunächst, nach einer Inkubationszeit von 4 h sowie 24 h und 48 h, eine signifikante Verminderung der relativen Genexpression von Ki67 bezogen auf die unstimulierten Zellen ermittelt. Erst nach einer Stimulationsdauer von 72 h lag eine im Vergleich zu unstimulierten Zellen verdoppelte Genexpression vor.

Die Genexpression von Ki67 gibt Auskunft über die mitotische Aktivität von Zellen. Die Genexpression von Ki67 nimmt von der späten G1-Phase bis zur G2-Phase zu und erreicht in der Mitosephase eine maximale Genexpressionsrate. Treten Zellen in die Ruhe- oder Differenzierungsphase ein, ist Ki67 nicht mehr detektierbar. Umgekehrt wird Ki67 bei Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus wieder nachweisbar. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Genexpressionsanstieg nach 72 h deutet darauf hin, dass die Stimulation mit EGF zu einer erhöhten Proliferation der humanen Plattenepithelkarzinomzellen geführt hat.

Es stellt sich aber die Frage, wie die zeitabhängigen Veränderungen der Genexpressionsrate, d.h. der initiale Abfall und der erst zeitverzögerte Anstieg, erklärt werden können. Bei der Interpretation der Daten von Ki67 muss bedacht werden, dass die Genexpression von Ki67 typischerweise zellzyklusabhängig schwankt – mit einer maximalen Genexpressionsrate in der Mitosephase und einem Abfall am Ende dieser Phase. Es wäre daher vorstellbar, dass die zeitabhängigen Veränderungen der Genexpression von Ki67 aus verschiedenen Phasen verschiedener Zellzyklen resultieren, die von den proliferierenden Zellen durchlaufen werden. Darüber hinaus könnten die Expressionsraten von Doc-1 und S100A7 in unstimulierten Zellen sowie in den ersten 24 h nach Stimulation ein Hinweis darauf sein, dass eine gesteigerte Proliferation durch die proliferationshemmende Wirkung dieser beiden Proteine im Sinne eines negativen Regelkreises zunächst verhindert wurde.

Mehrere Studien konnten bisher eine erhöhte Genexpression von Ki67 in oralen Plattenepithelkarzinomen nachweisen und mit Tumorprogression und schlechter Prognose korrelieren (Iamaroon et al., 2004; Kannan et al., 1996; Xie et al., 1999). Auch eine Beziehung zwischen erhöhter Genexpression von Ki67 in oralen Plattenepithelkarzinomen und geringer Differenzierung der Tumorzellen wurde vorgefunden (Vieira et al., 2008). Die Genexpression von Ki67 korreliert also mit Parametern, die auf ähnliche Weise in Beziehung zur Aktivität von EGF und EGFR gesetzt wurden.

Die Genexpression von EGF wurde in der vorliegenden Studie in BHY-Plattenepithelkarzinomzellen nach Stimulation mit EGF vermindert vorgefunden. Die Werte waren um etwa 30 bis 70 % gegenüber den Ausgangswerten reduziert, der niedrigste Wert lag nach 72 h vor. Diese Genexpressionsänderungen sind wahrscheinlich Ausdruck eines negativen Regulationsmechanismus, bei dem die Genexpression von EGF infolge ausreichender Konzentrationen im extrazellulären Medium vermindert wird.

Die Genexpressionsrate von EGFR änderte sich nach Stimulation humaner Plattenepithelkarzinomzellen mit dem EGF dagegen kaum gegenüber der Genexpression in unstimulierten Zellen. Das deutet darauf hin, dass die Tumorzellen konstitutiv Rezeptoren für die Signaltransduktion zur Verfügung stellen. Zu beachten ist auch hier wieder, dass die Werte zwar über die relative Genexpression informieren, aber keinerlei Aufschluss über potentielle Modifikationen während oder nach der Translation und damit über die tatsächlichen Proteinkonzentrationen geben.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass EGF teils stimulierende und teils suppressive Effekte auf die Expression der untersuchten Gene ausübt. Die unterschiedlichen Veränderungen im Genexpressionsmuster lassen differente Signalkaskaden vermuten. Am deutlichsten beeinflusst EGF jedoch die Genexpression der humanen Defensine und zwar insbesondere von hBD-1 und -3. Die humanen Defensine fungieren möglicherweise als Zielgene von EGF. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren, dass die humanen Defensine als Komponenten der angeborenen Immunabwehr zur Entstehung und Entwicklung von oralen Plattenepithelkarzinomen entscheidend beitragen könnten. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse aber auch, dass EGF möglicherweise nicht nur über die Beeinflussung von Proliferation und Apoptose zur Tumorgenese beiträgt, sondern auch über einen starken Einfluss auf Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Mehrere Studien wiesen in der Vergangenheit darauf hin, dass EGFR und seine nachgeschalte-

ten Signalkaskaden an entzündlichen und hyperproliferativen Erkrankungen der Gesichtshaut, insbesondere an Psoriasis und atopischer Dermatitis, beteiligt ist. Es wurde dabei vermutet, dass der Rezeptor sowohl angeborene Immunabwehrmechanismen als auch entzündliche Reaktionen in Keratinozyten reguliert. Signalkaskaden des EGFR führten zu einer veränderten, d.h. sowohl verminderten als auch gesteigerten Genexpression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren. Dazu zählt die Genexpressionssteigerung antimikrobieller Peptide wie des hBD-3 und des S100A4 sowie des Chemokins CXCL8/IL-8. Hinzu kommt die Verminderung der Genexpressionsrate von Chemokinen wie CCL2/MCP-1 und CXCL10/IP-10, die verschiedene Leukozyten rekrutieren (Pastore et al., 2005; Pastore und Mascia, 2008). Mascia et al. vermuteten letztlich, dass die Blockade von EGFR im Rahmen der gezielten Tumorthherapie nicht nur zu antiproliferativen Zwecken genutzt werden könnte, sondern auch über die Verstärkung der adaptiven Immunantwort tumorinhibierend wirken könnte (Mascia et al., 2003). Auch anhand von in vitro und in vivo Untersuchungen von epidermalen Plattenepithelkarzinomen der Gesichtshaut wurde EGFR eine immunmodulierende Rolle zugeschrieben. Die Aktivierung des EGFR und der Ras-MAPK-Signalkaskade führte hier zu einer Verminderung der Genexpression des Chemokins CCL27/CTACK. Es wurde vermutet, dass die transformierten Keratinozyten auf diese Weise eine T-Zell-vermittelte zytotoxische Immunantwort unterdrücken und damit das Immunabwehrsystem umgehen (Pivarcsi et al., 2007). Diese sowie die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind Hinweis darauf, dass die Aktivierung von EGFR nicht nur zu Tumorwachstum und Proliferation führt, sondern auch über die Genexpression von Komponenten des angeborenen Immunsystems zur Tumorgenese beiträgt.

Im Interesse zukünftiger Studien könnte stehen, die Regulationsmechanismen zu untersuchen, über die EGF auf die Expression der untersuchten Gene wirkt. Durch den spezifischen Einsatz von Inhibitoren könnte eine Beteiligung des EGFR sowie verschiedener Enzyme seiner Signalkaskade verifiziert oder auch ausgeschlossen werden. In dieser Studie wurden in vitro Untersuchungen an einer Zelllinie durchgeführt. Tumorzelllinien stellen eine homogene Zellpopulation aus Tumorzellen dar. In vivo setzt sich Tumorgewebe jedoch aus multiplen Zelltypen, d.h. auch Nichttumorzellen wie Fibroblasten und Immunzellen, sowie aus nichtzellulären Bestandteilen wie Matrixproteinen zusammen. Ein nächster Schritt könnte sein, den Einfluss von EGF in vivo anhand von Tumorbiopsien oder auch anhand einer Tumorzelllinie mit einem geringeren Differenzierungsgrad zu untersuchen. Auch gilt es weiter zu ermitteln, welche Auswirkungen hinter der Expressionsänderung dieser Gene in oralen Plattenepithelkarzinomen stehen und welche Bedeutung die jeweiligen Expressionsraten für die weitere Tumorprogression besitzen. Die Expressionsraten von Ki67 und von Doc-1 wurden

in vielen Studien als prognostische Faktoren herangezogen und zudem mit Parametern wie dem Tumorstadium, dem Metastasierungsrisiko und dem Invasionsgrad korreliert (Shintani et al., 2001; Xie et al., 1999). Von den humanen Defensinen wurde bisher nur hBD-2 als prognostischer Faktor in oralen Plattenepithelkarzinomen vorgeschlagen und mit histologischen Parametern in Beziehung gesetzt (Sawaki et al., 2002). In den vergangenen Jahren wurde aber immer weiter nach biologischen Markern gesucht, die frühzeitigen Hinweis auf ein malignes Geschehen und dessen Prognose geben könnten. Möglicherweise haben auch die übrigen humanen Defensine das Potential prognostischer Faktoren. Ein therapeutischer Aspekt hingegen könnte sich durch den Einsatz von rekombinantem hBD-1 ergeben, falls sich dessen Rolle als potentiell Tumorsuppressoren bestätigen sollte.

5 Zusammenfassung

Erhöhte Aktivierung von EGFR ist ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese des oralen Plattenepithelkarzinoms und fördert über multiple Signalkaskaden die Tumorprogression. Veränderungen im Expressionsmuster vieler anderer potentieller Protoonkogene und Tumorsuppressorgene weisen auf eine wichtige Rolle von EGF in Entstehung und Entwicklung des oralen Plattenepithelkarzinoms hin. Ziel der vorliegenden Studie war, einen Einfluss von EGF auf die Regulation der Genexpression von hBD-1, -2 und -3, DEFA1 und DEFA4, S100A7 und S100A4, von Doc-1 sowie von Ki67 in Zellen eines humanen Plattenepithelkarzinoms zu untersuchen.

Zellen der BHY-Plattenepithelkarzinomzelllinie wurden kultiviert und mit EGF über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA transkribiert. Die Änderung der relativen Genexpression von hBD-1, -2 und -3, DEFA1 und DEFA4, S100A7 und S100A4, von Doc-1 und Ki67 sowie von EGF und EGFR konnte dann mit Hilfe der RTq-PCR ermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass EGF teils stimulierende und teils suppressive Effekte auf die Expression der untersuchten Gene ausübt. Am deutlichsten aber wird die Genexpression von hBD-1 und -3 beeinflusst. Die Inkubation mit EGF führte zu einer Verminderung der relativen Genexpression von hBD-1, DEFA4 sowie von S100A4 sowie zu einer initialen Abnahme der Expression von DEFA1 und von Doc-1. Demgegenüber zeigten hBD-2 und -3 sowie sekundär auch Ki67 einen Anstieg der relativen Genexpression.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die untersuchten Gene, insbesondere die Gene von hBD-1 und -3 als Zielgene von EGF fungieren und damit zur Entstehung und Entwicklung von oralen Plattenepithelkarzinomen beitragen könnten. Die starke Beeinflussung der humanen β -Defensine impliziert, dass EGF nicht nur über die Beeinflussung von Proliferation und Apoptose zur Tumorgenese beiträgt, sondern auch über einen starken Einfluss auf das angeborene Immunsystem sowie auf potentielle Tumorsuppressorgene.

6 Literaturverzeichnis

- Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JHJM, de Boer WI, Hiemstra PS. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 167–174
- Abiko Y, Mitamura J, Nishimura M, Muramatsu T, Inoue T, Shimono M, Kaku T. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 143: 37–43
- Abiko Y, Suraweera AK, Nishimura M, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T. Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch* 2001; 438: 248–253
- Albrethsen J, Bøgebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* 2005; 5: 8
- Alowami S, Qing G, Emberley E, Snell L, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. *BMC Dermatol* 2003; 3: 1
- Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 959–965
- Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Nair MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B: 63–67
- Arnljots K, Sørensen O, Lollike K, Borregaard N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* 1998; 12: 1789–1795
- Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4: 31–39
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998; 102: 874–880

- Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000; 275: 29731–29736
- Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 1999; 163: 947–953
- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368: 331–335
- Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2119s–2123s
- Bonass WA, High AS, Owen PJ, Devine DA. Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 371–374
- Bongers V, Braakhuis BJ, Tobi H, Lubsen H, Snow GB. The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 595–598
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, Bowie AG, Ong SJ, Cook SJ, Sorensen OE, Manzo BA, Inohara N, Klein NJ, Nuñez G, Atherton JC, Bajaj-Elliott M. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* 2006; 281: 11637–11648
- Boye K, Grotterød I, Aasheim HC, Hovig E, Maelandsmo GM. Activation of NF-kappaB by extracellular S100A4: analysis of signal transduction mechanisms and identification of target genes. *Int J Cancer* 2008; 123: 1301–1310
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295–303
- Broome AM, Ryan D, Eckert RL. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 675–685
- Bullard RS, Gibson W, Bose SK, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, Hazen-Martin DJ, Lage JM, Keane TE, Ganz TA, Donald CD. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. *Mol Immunol* 2008; 45: 839–848

- Burke PM, Wiley HS. Human mammary epithelial cells rapidly exchange empty EGFR between surface and intracellular pools. *J Cell Physiol* 1999; 180: 448–460
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169–193
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597–601
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488–2492
- Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000; 22: 697–707
- Chantry A. The kinase domain and membrane localization determine intracellular interactions between epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 3068–3073
- Chaudhary A, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol* 2009; 1: 22
- Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, Liang OD, Schubert U, Hammes HP, Higazi AAR, Nawroth PP, Preissner KT, Bdeir K. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J* 2004; 18: 1306–1308
- Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem* 2009; 284: 1484–1494
- Chen Y, Chang J, Liao C, Wang H, Yen T, Chiu C, Lu Y, Li H, Cheng A. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008; 99: 1507–1514
- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1996; 271: 2935–2940

- Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71: 479–500
- Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 1986; 60: 1068–1074
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 24–37
- Deprez RHL, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 2002; 307: 63–69
- Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003; 83: 501–505
- Dong J, Wiley HS. Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J Biol Chem* 2000; 275: 557–564
- Droin N, Hendra JB, Ducoroy P, Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics* 2009; 72: 918–927
- Dunsche A, Ail Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 154–158
- Dunsche A, Ail Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 121–124
- Eberhard J, Menzel N, Dommisch H, Winter J, Jepsen S, Mutters R. The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human beta-defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 21–28
- Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 23–33
- Egloff AM, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer. *Semin Oncol* 2008; 35: 286–297

- Elenjord R, Ljones H, Sundkvist E, Loennechen T, Winberg JO. Dysregulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors by S100A4. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 185–188
- Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA, Ichiki AT. Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 1725–1733
- Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA. Characterization of gene expression profiles of 3 different human oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and metastatic capacities. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 918–927
- Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4735–4740
- Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1387–1397
- Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 1993; 2: 1301–1312
- Fulton C, Anderson GM, Zasloff M, Bull R, Quinn AG. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 1997; 350: 1750–1751
- Gambichler T, Skrygan M, Huyn J, Bechara FG, Sand M, Altmeyer P, Kreuter A. Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 163
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76: 1427–1435
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001a; 306: 257–264
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001b; 15: 1819–1821

- Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110: 763–773
- Ge G, Wu J, Wang Y, Lin Q. Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 914–920
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710–1715
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995–1001
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503–512
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 2005; 6: 57–64
- Gold KA, Lee HY, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2009; 115: 922–935
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553–560
- Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579–3584
- Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 1998; 69: 55–62
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriaievska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 2001; 276: 22699–22708

- Groenen LC, Walker F, Burgess AW, Treutlein HR. A model for the activation of the epidermal growth factor receptor kinase involvement of an asymmetric dimer? *Biochemistry* 1997; 36: 3826–3836
- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 689–708
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 714–721
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707–5713
- He C, Hobert M, Friend L, Carlin C. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem* 2002; 277: 38284–38293
- Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991; 251: 936–939
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 1026–1030
- Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991; 251: 1481–1485
- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 87–91
- Hobert ME, Kil SJ, Medof ME, Carlin CR. The cytoplasmic juxtamembrane domain of the epidermal growth factor receptor contains a novel autonomous basolateral sorting determinant. *J Biol Chem* 1997; 272: 32901–32909
- Honegger AM, Schmidt A, Ullrich A, Schlessinger J. Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4035–4044

- Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* 2000; 275: 32911–32918
- Howaldt HP, Reicherts M, Blecher C. Mundhöhlenkarzinom. *Onkologe* 2000; 6: 573–583
- Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 30–36
- Ji J, Zhao L, Wang X, Zhou C, Ding F, Su L, Zhang C, Mao X, Wu M, Liu Z. Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 480–486
- Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, Madsen P, Rasmussen HH, Gesser B, Etzerodt M, Honoré B, Celis JE, Thestrup-Pedersen K. Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 5–10
- Joly S, Maze C, McCray PB, Guthmiller JM. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1024–1029
- Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 23216–23225
- Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 1993; 315: 187–192
- Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999; 447: 227–231
- Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 210–214
- Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999; 253: 210–229
- Kannan S, Chandran GJ, Pillai KR, Mathew B, Sujathan K, Nalinakumary KR, Nair MK. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. *Clin Mol Pathol* 1996; 49: M170–M175

- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15: 254–264
- Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M. Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1997; 70: 120–127
- Kawsar HI, Weinberg A, Hirsch SA, Venizelos A, Howell S, Jiang B, Jin G. Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncol* 2009; 45: 696–702
- Kesting MR, Sudhoff H, Hasler RJ, Nieberler M, Pautke C, Wolff KD, Wagenpfeil S, Al-Benna S, Jacobsen F, Steinstraesser L. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol* 2009; 45: 731–736
- Kim TH, Kim HI, Soung YH, Shaw LA, Chung J. Integrin ($\alpha 6 \beta 4$) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1605–1612
- Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36: 334–339
- Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222–4228
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; 68: 2907–2915
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol* 2002; 168: 316–324
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95–125

- Kuwada SK, Lund KA, Li XF, Cliften P, Amsler K, Opresko LK, Wiley HS. Differential signaling and regulation of apical vs. basolateral EGFR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: C1419–C1428
- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 1997; 16: 281–294
- Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 1998; 17: 3385–3397
- Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 1998; 12: 3663–3674
- Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029–1040
- Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 275–281
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HH, Schutte BC, McCray PB, Ganz T. Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 1998; 222: 237–244
- Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; 44: 277–285
- Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001; 37: 401–418
- Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnsona NW, Warnakulasuriyaa KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of

- 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol* 2003; 39: 106–114
- Lundy FT, Orr DF, Gallagher JR, Maxwell P, Shaw C, Napier SS, Cowan CG, Lamey PJ, Marley JJ. Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncol* 2004; 40: 139–144
- Mainiero F, Pepe A, Yeon M, Ren Y, Giancotti FG. The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol* 1996; 134: 241–253
- Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, Kuick R, Merajver SD, Teknos TN. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 2779–2787
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, Larco JED, Stephenson JR, Todaro GJ. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 4684–4688
- Martinsson H, Yhr M, Enerbäck C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol* 2005; 14: 161–168
- Mascia F, Mariani V, Girolomoni G, Pastore S. Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 303–312
- McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998; 20: 250–265
- Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer* 2006; 43: 60–66
- Merlano M, Occelli M. Review of cetuximab in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3: 871–876
- Meyer JE, Harder J. Antimicrobial peptides in oral cancer. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3119–3130
- Meyer JE, Harder J, Sipos B, Maune S, Klöppel G, Bartels J, Schröder JM, Gläser R. Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 239–243

- Miyazaki H, Patel V, Wang H, Ensley JF, Gutkind JS, Yeudall WA. Growth factor-sensitive molecular targets identified in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma using microarray analysis. *Oral Oncol* 2006; 42: 240–256
- Mizukawa N, Sawaki K, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T. Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 2005–2007
- Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 2009; 283: 125–134
- Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170–174
- Moriyama-Kita M, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schäfer BW, Sasaki T, Yamamoto E. Correlation of S100A4 expression with invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40: 496–500
- Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Müller GA, Flad T. Human alpha-defensins HNP-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1311–1324
- Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 2003; 39: 213–221
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4: S9–15
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 2004; 111: 273–281
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 594–604

- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110: 775–787
- Oijen M, Slootweg P. Review-Oral Field Cancerization: Carcinogen-induced Independent Events or Micrometastatic Deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 249–256
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19: 3159–3167
- O’Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718–6724
- Pantelis A, Wenghoefer M, Haas S, Merkelbach-Bruse S, Pantelis D, Jepsen S, Bootz F, Winter J. Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol* 2009; 45: 526–530
- Pastore S, Mascia F. Novel acquisitions on the immunoprotective roles of the EGF receptor in the skin. *Expert Rev Dermatol* 2008; 3: 525–527
- Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Mariani V, Girolomoni G. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *J Immunol* 2005; 174: 5047–5056
- Pereira M, Oliveira D, Landman G, Kowalski L. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc* 2007; 73: 339
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; 1: 92–5
- Pivarcsi A, Müller A, Hippe A, Rieker J, van Lierop A, Steinhoff M, Seeliger S, Kubitza R, Pippirs U, Meller S, Gerber PA, Liersch R, Buenemann E, Sonkoly E, Wiesner U, Hoffmann TK, Schneider L, Piekorz R, Enderlein E, Reifenberger J, Rohr UP, Haas R, Boukamp P, Haase I, Nürnberg B, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19055–19060
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 11–31

- Prohászka Z, Németh K, Csermely P, Hudecz F, Mező G, Füst G. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. *Mol Immunol* 1997; 34: 809–816
- Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998; 152: 1247–1258
- Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, Marotta ML, Mirza M, Jiang B, Kiser P, Medvik K, Sieg SF, Weinberg A. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 2003; 17: F39–F48
- Rasse M. Indikationen zur chirurgischen Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. *Wien Med Wochenschr* 2008; 158: 243–248
- Rautava J, Jee KJ, Miettinen PJ, Nagy B, Myllykangas S, Odell EW, Soukka T, Morgan PR, Heikinheimo K. ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol* 2008; 44: 227–235
- Reichart PA. Primärprävention des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen. *Mund Kiefer GesichtsChir* 2000; 4: 357–364
- Reuther T, Posselt NK, Rabbels J, Kübler AC. Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. *Mund Kiefer GesichtsChir* 2006; 10: 18–29
- Rigby AC, Grant CW, Shaw GS. Solution and solid state conformation of the human EGF receptor transmembrane region. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1371: 241–253
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154–160
- Rittà M, Andrea MD, Mondini M, Mazibrada J, Giordano C, Pecorari G, Garzaro M, Landolfo V, Schena M, Chiusa L, Landolfo S. Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression. *Head Neck* 2009; 31: 318–327
- Robbins K, Atkinson J, Byers R, Cohen J, Lavertu P, Pellitteri P. The use and misuse of neck dissection for head and neck cancer¹. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 91–102
- Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000; 79: 1669–1674

- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183–232
- Sapkota D, Bruland O, Bøe OE, Bakeer H, Elgindi OAA, Vasstrand EN, Ibrahim SO. Expression profile of the S100 gene family members in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 607–615
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; 133: 579–584
- Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients under 40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 129–133
- Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T. High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 2103–2107
- Scheifele C, Reichart PA. Orale Leukoplakien bei manifestem Plattenepithelkarzinom. *Mund Kiefer GesichtsChir* 1998; 2: 326–330
- Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992; 9: 383–391
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–322
- Schultze J, Schillmöller H, Roldán J, Wiltfang J, Kimmig B. Die präoperative Radio-Chemotherapie beim fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinoms. *Oral Maxillofac Surg* 2006; 10: 249–257
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2129–2133
- Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; 76: 1436–1439
- Sherman H, Froy O. Expression of human beta-defensin 1 is regulated via c-Myc and the biological clock. *Mol Immunol* 2008; 45: 3163–3167
- Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 1993; 259: 1604–1607

- Shintani S, Matsuo K, Crohin CC, McBride J, Tsuji T, Donoff RB, Posner M, Todd R, Wong DT. Intragenic mutation analysis of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in malignant human oral keratinocytes. *Cancer Res* 1999; 59: 4142–4147
- Shintani S, Ohyama H, Zhang X, McBride J, Matsuo K, Tsuji T, Hu MG, Hu G, Kohno Y, Lerman M, Todd R, Wong DT. p12(DOC-1) is a novel cyclin-dependent kinase 2-associated protein. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6300–6307
- Shintani S, Mihara M, Terakado N, Nakahara Y, Matsumura T, Kohno Y, Ohyama H, McBride J, Kent R, Todd R, Tsuji T, Wong DT. Reduction of p12DOC-1 expression is a negative prognostic indicator in patients with surgically resected oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2776–2782
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989; 243: 1074–1076
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 717–727
- Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 229–233
- Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2474
- Spector J, Sessions D, Haughey B, Chao K, Simpson J, El Mofty S, Perez C. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2009; 111: 1079–1087
- Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol* 1986; 15: 276–279
- Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, Pahl R, Reiss K, Herzig KH, Schubert S, Schreiber S, Fölsch UR, Rosenstiel P, Arlt A. The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida esophagitis*. *BMC Immunol* 2009; 10: 36

- Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, mei Ho S, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 8542–8549
- Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 170: 5583–5589
- Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005; 174: 4870–4879
- Sørensen OE, Thapa DR, Roupé KM, Valore EV, Sjöbring U, Roberts AA, Schmidtchen A, Ganz T. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 2006; 116: 1878–1885
- Tanner KG, Kyte J. Dimerization of the extracellular domain of the receptor for epidermal growth factor containing the membrane-spanning segment in response to treatment with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1999; 274: 35985–35990
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 2017–2020
- Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 51–61
- Torske KR. Malignant lesions of the oral cavity. In: Werning JW, Hrsg. Oral cancer. New York: Thieme, 2007
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 69–75
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5276–5287
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant

- expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309: 418–425
- Uozumi M, Murao S, Katayama N, Kitazawa S, Amatsu M, Maeda S. Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells. *Cancer Lett* 2000; 149: 135–141
- Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 1992; 79: 1538–1544
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998; 101: 1633–1642
- Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol* 2005; 76: 1293–1303
- Vieira FLD, Vieira BJ, Guimaraes MAM, Aarestrup FM. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health* 2008; 8: 25
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489–501
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 1197–1206
- Wahl M, Carpenter G. Selective phospholipase C activation. *Bioessays* 1991; 13: 107–113
- Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003; 35: 376–383
- Ward CW, Hoyne PA, Flegg RH. Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins* 1995; 22: 141–153
- Warnakulasuriya S, Johnson N, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 575–580

- Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Bergé S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J. Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* 2008a; 8: 290
- Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, Novak N, Bergé S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008b; 37: 660–663
- Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, Scott RW. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* 1989; 264: 11200–11203
- Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 78–88
- Wittekind C, Meyer HJ. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2010
- Wong DT, Todd R, Tsuji T, Donoff RB. Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 319–328
- Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 8865–8874
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8880–8885
- Xie X, Angelis PD, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 502–509
- Yamada T, Takagi M, Shioda S. Evaluation of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 67–70
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 2002; 169: 2516–2523
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525–528

- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemottract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 9–14
- Zhou G, Xie TX, Zhao M, Jasser SA, Younes MN, Sano D, Lin J, Kupferman ME, Santillan AA, Patel V, Gutkind JS, Ei-Naggar AK, Emberley ED, Watson PH, Matsuzawa SI, Reed JC, Myers JN. Reciprocal negative regulation between S100A7/psoriasin and beta-catenin signaling plays an important role in tumor progression of squamous cell carcinoma of oral cavity. *Oncogene* 2008; 27: 3527–3538
- Zimmermann GR, Legault P, Selsted ME, Pardi A. Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* 1995; 34: 13663–13671

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. R. H. Reich, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Dr. Dr. M. Wenghoefer, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. J. Winter, Leiter des molekular- und zellbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gilt mein Dank für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung und der Korrektur der Arbeit.

Meinem Bruder Jan-Philipp danke ich für die Unterstützung bei der technischen Umsetzung der Arbeit in L^AT_EX.